

FABRÍCIA RIBEIRO MATTOS

**MODELO COMPUTACIONAL PARA SIMULAR A REDUÇÃO DA
MICROBIOTA CONTAMINANTE EM PEPINOS (*Cucumis sativus* L.)
SUBMETIDOS A TRATAMENTO TÉRMICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

Aos meus amáveis pais, José Carlos e Ana Maria.

À minha doce e bela irmã, Larissa.

À toda minha família, base da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sua presença e luz constante em minha vida, tornaram possível a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela infra-estrutura na realização do curso.

À North Carolina State University, ao Departamento de Food Science e ao laboratório da USDA pela disponibilidade de recursos humanos e financeiros no apoio a esta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Guido, pela orientação segura e competente, dedicada com muita atenção e paciência para realização deste trabalho.

Ao professor Fred por me proporcionar raras oportunidades e pela confiança constante em meu trabalho.

À professora Sandra, conselheira para todos os momentos, que se dedicou sempre com muita alegria para conclusão deste trabalho.

À Laura e ao Dr. Fasina pelo constante apoio profissional e pessoal durante minha pesquisa nos EUA.

Ao Dr. Fleming pelo exemplo de sabedoria, humildade e simplicidade.

Aos “velhos” amigos da graduação, Patrícia, Elen, Cecília, Silmara, Loo, Aline, Renata, Aureliano, Eduardo e Alcinéia que mantiveram presença dando aquela força.

Aos novos amigos conquistados durante o mestrado, principalmente do armazenamento, Solenir, Ednilton, Isabel, Ivano, Wederson, Sergio, Gilmar, Silas e Cristiane, os momentos de convívio foram poucos, mas muito intensos.

À Guainuby e sua família pelo carinho e atenção dedicados ao longo desse período.

À minha família, meus pais José e Ana, minha irmã Larissa, meus avós, meus tios e tias, meus primos e primas pelas orações de fé que sustentaram essa minha caminhada.

A Rinaldo pelo seu amor paciente, companheirismo e amizade que tanto contribuiu para a conclusão de mais esta etapa.

BIOGRAFIA

Fabrcia Ribeiro Mattos, filha de José Carlos Filho e Ana Maria Ribeiro Mattos, nasceu em Vitória, Estado do Espírito Santo, em 18 de março de 1974.

Em março de 1993, iniciou o Curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em dezembro de 1997.

Em março de 1998, iniciou o Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Transferência de Calor aplicado a alimentos minimamente processados.

Desenvolveu sua pesquisa de mestrado no laboratório da USDA, da North Carolina State University nos EUA.

Em abril de 2000, submeteu-se ao exame final de defesa de tese.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. PROCESSAMENTO MÍNIMO DE PRODUTOS VEGETAIS.....	4
2.1.1. Localização microbiana.....	5
2.1.2. Processamento mínimo de frutas e hortaliças.....	6
2.1.3. Processo térmico mínimo.....	7
2.2. MODELAGEM DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS EM ALIMENTOS.....	9
2.2.1. Método Geral ou Gráfico.....	10
2.2.2. Método Fórmula de Ball.....	11
2.3. CINÉTICA DE MORTE MICROBIANA.....	12
2.3.1. Curva de sobreviventes e tempo de redução decimal (D).....	12
2.3.2. Curva do tempo de morte térmica.....	13
2.3.3. Razão Letal.....	14

	Página
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. LOCALIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS DENTRO DOS PEPINOS.....	16
3.1.1. Determinação do diâmetro do pepino.....	17
3.1.2. Localização dos microrganismos nas diferentes partes do fruto..	17
3.1.3. Contagem da microbiota contaminante.....	20
3.2. MODELO DE TRANSFERÊNCIA DE CALOR E CINÉTICA DE MORTE DE MICRORGANISMOS PARA BRANQUEAMENTO DE PEPINOS.....	21
3.2.1. Modelo de transferência de calor.....	21
3.2.2. Modelo da cinética de morte microbiana.....	29
3.2.3. Validação do modelo.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. LOCALIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS NO FRUTO.....	35
4.1.1. Parâmetros e propriedades físicas do pepino.....	35
4.1.2. Localização dos microrganismos no pepino.....	35
4.1.3. Distribuição da microbiota natural no pepino.....	38
4.2. MODELAGEM COMPUTACIONAL.....	39
4.2.1. Comparação entre valores simulados e experimentais.....	40
4.2.2. Localização mais provável dos microrganismos.....	42
4.2.3. Análise de sensibilidade para os parâmetros cinéticos.....	45
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
APÊNDICE.....	56

LISTA DE QUADROS

	Página
1. Equações em diferenças finitas para um cilindro.....	26
2. Dados de entrada do programa computacional.....	31
3. Medida das propriedades físicas em pepinos de tamanho 3B.....	36
4. Localização dos microrganismos na parte central em pepinos de tamanho 3B.....	38
5. Distribuição microbiana em diferentes partes do pepino inteiro.....	39
6. Efeito do processo térmico mínimo sobre a microbiota em pepinos frescos.....	42
7. Resultados simulados da localização dos microrganismos.....	44
8. Análise de sensibilidade do valor de z	46
9. Análise de sensibilidade do valor de D.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Locais aproximados das medidas dos diferentes diâmetros do pepino para as regiões próximas ao caule (D_1), centro (D_2) e flor (D_3).....	17
2. Corte transversal do pepino mostrando a região central e as extremidades próximas do caule e da flor.....	19
3. Discretização do domínio.....	25
4. Fluxograma geral do modelo de transferência de calor - cinética de morte microbiana (TCCMM).....	32
5. Corte transversal da região central do pepino com o endocarpo removido.....	37
6. Comparação entre os valores da redução logarítmica de aeróbios mesófilos experimental e simulada pelo modelo TCCMM em diferentes temperaturas de branqueamento ($D_{52}=4,5$ min e $z=7,8$ °C).....	41
7. Variação dos valores de morte térmica (F_t^z) com a profundidade, 0,5 segundos antes do final do branqueamento.....	43
8. Distribuição de temperatura no pepino ao final do branqueamento....	45
9. Perfil de temperatura e número de microrganismos sobreviventes no pepino durante o processo de branqueamento a 80 °C.....	46
1A. Redução de microrganismos durante o branqueamento a 80 °C.....	57

	Página
2A. Redução de microrganismos durante o branqueamento a 65 °C.....	58
3A. Redução de microrganismos durante o branqueamento a 50 °C.....	58

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição
Bi	número de Biot
c_p	calor específico a pressão constante (J/kg·K)
D	tempo de redução decimal (min)
F_t^z	tempo de morte térmica (min)
F_0	tempo de morte térmica a 121,1 °C
h	coeficiente de transferência convectiva de calor (W/m ² ·K)
k	condutividade térmica (W/m·K)
r	coordenada radial (m)
ℓ	coordenada axial (m)
L	razão letal
T_i	temperatura inicial (°C)
t	tempo (s)
T_∞	temperatura do fluido (°C)
T_{ref}	temperatura de referência (°C)
z	resistência térmica (°C)
Letras gregas	
ρ	massa específica (kg/m ³)
Δ	diferença entre valores

RESUMO

MATTOS, Fabrícia Ribeiro, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2000. **Modelo Computacional para Simular a Redução da Microbiota Contaminante em Pepinos (*Cucumis sativus* L.) Submetidos a Tratamento Térmico**. Professor Orientador: Guido de Souza Damasceno. Professores Conselheiros: Frederico José Vieira Passos e Sandra Maria Couto.

Frutas e vegetais frescos podem conter vários microrganismos que causam deterioração e problemas quanto à segurança alimentar. Apesar da maioria das evidências mostrarem que a população microbiana está localizada próxima da superfície do fruto, existem relatos sobre localização interna. Métodos eficazes para a inativação desses organismos exigirão informações sobre sua localização. Desenvolveu-se um modelo computacional para determinar a redução microbiana em pepinos frescos submetidos a um processo de branqueamento. O modelo combina equações de transferência de calor transiente em duas dimensões e de cinética de morte microbiana. O tempo de morte térmica (F_t^z) para qualquer localização dentro do pepino foi calculado pelo modelo e usado para prever o tempo necessário para a redução em 2-log da carga microbiana, durante o branqueamento em água quente. Pepinos com diâmetro entre 45 e 55 mm foram branqueados a 60, 80 e 90 °C por 112, 12 e 7 segundos, respectivamente. Os pepinos branqueados foram homogêneos e amostras foram retiradas para determinação do

número da microbiota de aeróbios mesófilos e esporos aeróbios mesófilos. Os resultados experimentais da contagem de aeróbios mesófilos e os resultados preditos pelo modelo computacional foram comparados, demonstrando não existir diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os valores encontrados para redução microbiana (em log) na faixa de temperatura empregada. A variação do tempo de morte térmica (F_t^z) com a posição obtida a partir do modelo mostrou que os microrganismos estudados estão localizados numa faixa de 0,65mm de espessura a partir da superfície do fruto. A profundidade da distribuição microbiana foi baseada em resultados simulados para alcançar, durante o branqueamento de pepinos, uma redução microbiana de 99,0 e 99,9% (2 e 3 ciclos log) nas temperaturas especificadas. O modelo de transferência de calor e cinética de morte microbiana (TCCMM) deverá ser útil na determinação de processos térmicos mínimos para inativação da microbiota em pepinos, sem perda de características de qualidade. De acordo com a Food and Drug Administration (FDA) tem sido recomendada a redução em 5-log de microrganismos patogênicos para alguns grupos de alimentos. Os tempos simulados pelo modelo TCCMM, para que essa redução fosse atingida foram de 186, 18 e 9 segundos a 60, 80 e 90 °C, respectivamente. Entretanto, devido à limitação do número inicial de microrganismos no pepino e presença de organismos resistentes ao calor, não foi possível alcançar experimentalmente, a redução em 5-log da carga microbiana.

ABSTRACT

MATTOS, Fabrícia Ribeiro, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April, 2000.
Computational Model to Simulate a Natural Microflora Inactivation in Cucumbers (*Cucumis sativus* L.) under Thermal Process. Advisor: Guido de Souza Damasceno. Committee Members: Frederico José Vieira Passos e Sandra Maria Couto.

Fresh fruits and vegetables may contain numerous microorganisms that relate to spoilage and food safety concerns. Although most evidence indicates that the microbial population is located near the fruit surface, there have been reports of internal location. Effective methods for inactivation of these organisms will require information about their location. A model has been developed to determine the microbial distribution in fresh cucumbers during the blanching process. The model combines two dimensional transient heat transfer and microbial inactivation kinetics equations. Thermal death time (F_t^Z) at any location within the cucumber was calculated from the model and used to predict microbial reduction of 2-log when cucumbers were blanched in hot water. Cucumbers (between 45 to 55mm diameter) were blanched at temperatures of 60°, 80° and 90°C for 112, 12 and 7 seconds respectively. Blanched cucumbers were homogenized and plated to determine cell counts for total aerobic microflora and aerobic spores. Experimental results for total aerobes and those predicted from the model were compared, which showed no significant

statistical difference ($P \geq 0.05$) between the reduction values for the blanching temperatures used. Blanching did not reduce the number of microbial spores, as expected. Variation in thermal death time (F_t^z) with location as obtained from the model showed that total aerobic microorganisms were located within 0.65mm of the fruit surface. Microbial load depth was based on simulation results for cucumbers blanched to achieve 2 and 3 log reductions at specified temperatures. The Heat Transfer-Microbial Kinetic (HTMK) model should be useful in determining minimal thermal process for inactivation of cucumber microflora without losing quality factors. According with Food and Drug Administration (FDA), the 5-log reductions have been recommended recently for selected commodities. The times simulated by the HTMK model for attaining this microbial reduction were 186, 18 and 9 seconds at 60, 80 and 90 °C, respectively. However, the 5-log reduction could not be attained experimentally due to limiting initial number of microorganism on/in cucumbers and the presence of heat resistant spores.

1. INTRODUÇÃO

A oferta e a demanda de produtos frescos minimamente processados, prontos para consumo, tem expandido de forma significativa. Entretanto, tem-se notado, também, a ocorrência de surtos causados pela contaminação de alimentos por patógenos, o que tem chamado atenção para aspectos de segurança alimentar.

A população microbiana geralmente encontrada em frutas e hortaliças pode variar de 10^2 a 10^8 UFC/g e nestes produtos, podem também ser encontrados microrganismos patogênicos que, em alguns casos, têm sido relacionados à ocorrência de doenças.

Pesquisadores têm investigado uma variedade de tratamentos, usando processos de lavagem com sanitizantes, para remover microrganismos de frutas e hortaliças. Em geral, esses métodos resultam na redução de 90 a 99% do número inicial de células microbianas.

Exemplos de tratamentos de lavagens de frutas e vegetais incluem o uso de compostos à base de cloro, de peróxido de hidrogênio, e de fosfato tri-sódico, separadamente ou em combinações. Na água de lavagem e resfriamento de pepinos com dióxido de cloro observou-se redução do número de bactérias. Entretanto, tal redução não foi efetiva nos frutos.

A ineficácia de tratamentos de lavagem para remoção de bactérias de frutas e vegetais frescos tem sido atribuída a uma variedade de fatores: biofilme de microrganismos, bolsas hidrofóbicas, película de cera, estreitas

ranhuras e buracos ou defeitos no tecido. A inativação de agentes sanitizantes, também pode ocorrer por materiais orgânicos e componentes do tecido da planta, antes de entrar em contato com as bactérias na superfície.

Além disso, existem evidências da presença de microrganismos localizados dentro do tecido saudável de pepinos e de outros frutos. Pesquisas mostraram que bactérias podem atingir o interior de pepinos, em boas condições, através de estômatos.

O conhecimento da quantidade e tipo de microrganismos dentro do pepino é importante para o controle da fermentação no fruto. O método para controlar a fermentação exige que a microbiota natural seja reduzida antes da fermentação, permitindo assim que a cultura “starter” predomine durante a fermentação.

O controle da fermentação, combinado com um processo de branqueamento, tem sido considerado como uma alternativa para se reduzir a utilização de concentrações elevadas de sal na preservação de pepinos.

Da mesma forma, a redução na contagem de células microbianas, em pepinos frescos para pickles, pode ser importante para a segurança de alguns produtos não acidificados e pickles refrigerados.

Torna-se importante, portanto, o estudo das condições de aquecimento mínimas necessárias para reduzir a microbiota em pepinos, sem significativamente alterar as suas propriedades sensoriais. Tentativas prévias com o objetivo de reduzir o número de microrganismos em pepinos frescos para pickles, por processos de lavagem ou pelo uso de agente sanitizante à base de cloro, resultou tipicamente na redução de somente um ou dois ciclos log na microbiota de aeróbios mesófilos aeróbios.

Dessa forma, o uso de um modelo matemático para descrever a transferência de calor dentro do pepino, combinado com dados que descrevam a inativação térmica bacteriana será importante para a obtenção de um produto seguro, otimizando-se o processamento. Evita-se assim, o superprocessamento térmico enquanto os fatores de qualidade são mantidos.

Os objetivos do presente trabalho são:

- Determinação aproximada da localização da microbiota natural em pepinos;

- Desenvolver um modelo computacional que combine transferência de calor e cinética de morte microbiana;
- Validar o modelo utilizando dados experimentais;
- Aplicar o modelo na determinação do tempo de processamento e localização microbiana em produtos vegetais, usando o pepino como objeto de estudo.

Embora, o pepino tenha sido usado para as finalidades deste trabalho, o modelo poderá ser adaptado e aplicado a outros frutos e vegetais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PROCESSAMENTO MÍNIMO DE PRODUTOS VEGETAIS

A demanda, dos consumidores, por alimentos mais frescos e mais naturais tem resultado em uma tendência de se submeterem os alimentos a processos mais brandos que inativem microrganismos e preservem a qualidade do alimento. Neste contexto, a capacidade de predizer margens de segurança para processos de inativação e preservação torna-se particularmente importante (BARANYI, et al., 1996).

Segundo Beuchat e Altekruise citado por CHERRY (1999), a preocupação com patógenos em alimentos frescos tem aumentado, como resultado do crescimento de surtos de doenças causadas por alimentos contaminados. Frutas e vegetais frescos, cortados e minimamente processados são reconhecidamente mais vantajosos em termos nutricionais do que aqueles processados convencionalmente. Avanços contínuos observados nas práticas agronômicas, no processamento, na preservação, distribuição e comercialização têm possibilitado, às indústrias agrícolas e de alimentos, o fornecimento de produtos de alta qualidade aos consumidores, a qualquer momento durante o ano. Infelizmente, junto a esse aumento na disponibilidade de alimentos frescos, aumenta-se também a possibilidade de ocorrência de doenças em humanos causadas por microrganismos patogênicos.

Esses microrganismos variam no ambiente global e os alimentos podem ser inadvertidamente, contaminados por uma grande variedade de microrganismos. Medidas devem ser tomadas para controlar a contaminação do produto na fazenda e durante o manuseio, o transporte, o processamento, a venda e o preparo, visando a segurança alimentar (CHERRY, 1999).

O consumidor espera produtos agrícolas com qualidade elevada nos locais de venda. As variações nos tamanhos, formas, topografia da superfície (áspera, presença de fendas, suave), disponibilidade de entradas para o interior do tecido (estômatos), fragilidade, e perecibilidade entre os produtos apresentam um desafio para aqueles que trabalham com segurança alimentar. Componentes do ambiente, solo, umidade, fezes de animais e deterioração causada por microrganismos, podem contribuir de várias maneiras para a contaminação (CHERRY, 1999).

2.1.1. Localização microbiana

A ineficiência do emprego de processos de lavagem ou de sanitização para remover bactérias do produto é atribuída, provavelmente, à localização dos microrganismos em regiões protegidas próximas à superfície do vegetal. Estas regiões podem ser os estômatos, danos no tecido ou outra parte do material do produto, que geralmente, apresenta natureza hidrofóbica protegendo a bactéria, contra a ação de soluções sanitizantes (MENELEY e STANGHELLINI, 1974).

SAPERS e SIMMONS (1999) apresentaram um estudo, onde a tentativa de remoção de *E. coli* por processos de lavagem na maçã, não foi eficiente, pelo fato de células bacterianas estarem aderidas ao fruto. A maior quantidade de microrganismos pode ser encontrada nas regiões do caule e “cálice” da maçã, e via “cálice”, a bactéria pode atingir o interior do fruto. O desafio para processadores de alimentos é inativar ou remover esses microrganismos da superfície da fruta antes da etapa de extração do suco fresco para produção da cidra.

A irregularidade da superfície apresentada em frutas, como o melão, favorece a adesão dos microrganismos. Isto acarreta uma redução do efeito dos métodos de lavagem e ação de agentes químicos, tornado-se difícil atingir

a redução, em 5 ciclos logarítmicos de microrganismos patogênicos, recomendados pela Food and Drug Administration (FDA) para algumas classes de alimentos (CHERRY, 1999).

A distribuição natural de microrganismos nas frutas é muito pouco conhecida. PAO e DAVIS (1999) demonstraram que uma inativação em 5 ciclos log de *E. coli* na superfície de laranjas, resultou na redução em apenas 3,5 logs no suco, comparado aos frutos com a superfície não tratada. No mesmo estudo, apesar de o tratamento para a superfície ter sido aplicado para reduzir mais do que 5 ciclos log, a carga microbiana natural do suco de laranja foi reduzida em somente 1,5 a 2,0 ciclos log. Esta evidência indireta suporta a hipótese de que a população microbiana natural esteja distribuída pelo interior do fruto.

Adição de Tween 80[®], ao hipoclorito reduziu o número de microrganismos em 99,6% nas folhas de alface, mas resultou em alterações sensoriais. Falhas nos processos de lavagem usando água convencional e adicionada de hipoclorito para remover a microbiota foram atribuídas à localização das bactérias sobreviventes em bolsas hidrofóbicas na superfície das folhas de alfaces (ADAMS et al., 1988).

2.1.2. Processamento mínimo de frutas e hortaliças

Indústrias têm respondido ao desenvolvimento de tecnologia em processamentos mínimos que atinjam uma redução biológica significativa, que aumentem o tempo de prateleira do produto, e ainda mantenham as características delicadas de um produto fresco. Estes processos mínimos representam um importante desafio, desde que superprocessamentos resultam em danos ao produto, enquanto subprocessamentos podem representar um problema à saúde pública (MERMELSTEIN, 1999).

Vários novos processos tecnológicos em vigor estão disponíveis para promover reduções na carga microbiana. Pulsos elétricos, luz ultravioleta, processos térmicos mínimos, irradiação, processos ôhmicos e sistemas de processamento sob alta pressão têm sido oferecidos comercialmente. A aplicabilidade de cada tecnologia para um produto específico irá depender das características do produto e do patógeno alvo, o qual pode ser resistente ao

processo. Cada processo mínimo é responsável por uma redução de patógenos, dessa forma, não alcança uma inativação apropriada para que se garanta a esterilidade comercial. Portanto, os produtos devem ser mantidos sob estocagem e distribuição refrigerada para reduzir a possibilidade de deterioração (SIZER e BALASUBRAMANIAM, 1999).

Agentes químicos usados em combinação com as técnicas recentes de pasteurização a frio, como pulsos elétricos e processos sob alta pressão, têm atraído interesse, em lugar de tratamentos térmicos para esterilização de alimentos (MERMELSTEIN, 1999). Já que esses processos são relativamente novos, algumas questões, ainda precisam ser respondidas, tais como: determinação dos mecanismos de inativação, o microrganismo específico resistente ao método não térmico particular, e aqueles microrganismos que podem não seguir uma inativação linear (log da concentração microbiana vs. tempo) durante os processos não térmicos.

O uso desses processos, ainda é um pouco limitado, pois além de terem um custo muito mais elevado, precisam muitas vezes de ser associados a processos térmicos mínimos para alcançarem a redução microbiológica ou enzimática desejada.

2.1.3. Processo térmico mínimo

Segundo Lopez, citado por RAMASWAMY e SINGH (1997), o termo “processo térmico mínimo” foi introduzido pelos US Food and Drug Administration em 1977 sendo definido como “a aplicação de calor ao alimento, tanto antes como depois de lacrado em embalagens hermeticamente fechadas, por um período de tempo e em temperaturas adequadas para garantir a inativação de microrganismos relevantes à saúde pública”.

Clostridium botulinum é o microrganismo de maior preocupação quanto à saúde pública em alimentos de baixa acidez ($\text{pH} > 4,5$), já que nesses alimentos, o esporo pode germinar, produzindo toxina. Devido à alta resistência térmica dos esporos, temperaturas de 115 a 125 °C são, comumente, empregadas para o processamento desses alimentos. Com respeito a alimentos ácidos e de acidez média ($3,7 < \text{pH} < 4,5$) o processo é usualmente baseado na resistência térmica de bactéria na forma vegetativa ou enzima

causadoras de deterioração, as quais são facilmente inativadas mesmo em temperaturas abaixo de 100 °C. Os processos térmicos para esse tipo de alimento são, portanto, normalmente conduzidos em água quente.

A maioria dos vegetais frescos pode ser estocado somente por um curto período de tempo, mesmo a temperaturas tão baixas quanto -20 °C. Isso ocorre, em razão das mudanças na textura, cor, sabor e qualidades nutricionais, provenientes da ação de várias enzimas que ainda estão ativas após a colheita. Segundo Kohman citado por WILLIAMS et al. (1986), um breve tratamento térmico poderia inativar enzimas e estabilizar os vegetais congelados, evitando sabores indesejáveis durante o período de estocagem.

O termo “branqueamento” foi, originalmente, usado para designar os tratamentos térmicos em processamento de alimentos para estocagem congelada a qual evita alterações que ocorrem em alimentos não tratados. O branqueamento (70 a 105 °C) está associado com a inativação da atividade enzimática, da mesma forma que a pasteurização (60 a 85 °C) é associada com a inativação de microrganismos (WILLIAMS et al., 1986).

O branqueamento é a primeira forma de inativar enzimas indesejáveis e reduzir a carga microbiana, antes da etapa de congelamento, enquanto que simultaneamente, promove a remoção de gases do tecido, a limpeza e a estabilização da cor (BARRET e THEERAKULKAIT, 1995).

As vantagens desse processo incluem a estabilização de textura (mudanças antes causadas por enzimas), cor, sabor e qualidade nutricional; a inativação de microrganismos. As desvantagens incluem algumas perdas na textura (causada também pelo congelamento e descongelamento), cor, sabor, e qualidade nutricional causada pelo processo térmico; formação de gosto de cozido, alguma perda de sólidos solúveis (especialmente em branqueamento em água quente); e impacto ambiental adverso devido à necessidade do uso de grandes quantidades de água e energia. Portanto, a otimização do processo de branqueamento é crucial (WILLIAMS et al., 1986).

Um grande número de alimentos, prontos para o consumo, depende, para sua segurança, da combinação de tratamentos térmicos brandos com posterior refrigeração, que são agora disponíveis. Pesquisadores têm considerado a importância do desenvolvimento seguro de processos térmicos utilizando como ferramenta modelos computacionais (BELLARA et al., 1999).

Muitos estudos foram desenvolvidos sobre a transferência de calor em alimentos e a inativação de bactérias e enzimas. Entretanto, muito pouco tem sido feito no sentido de se combinar os efeitos térmicos com a inativação microbiana e enzimática.

Alguns trabalhos, contudo, têm sido desenvolvidos com bactérias capazes de esporular e com enzimas atuando como indicadores do binômio tempo-temperatura. BROWN et al. (1984) preparou cubos de alginato e purê de alimento inoculado com bactérias capazes de esporular. A transferência de calor e a destruição dos esporos nas partículas quando aquecidas foram simuladas por modelos matemáticos, entretanto a comparação entre os valores experimentais e teóricos resultou em desvios significativos.

Segundo Teixeira et al. citado por BELLARA et al. (1999), foram desenvolvidos modelos para simular a condução de calor através de latas de purê de ervilha inoculada com esporos de *Bacillus stearothermophilus*. Os resultados experimentais obtidos para a destruição desses esporos foram usados para determinar a sua resistência térmica. Os resultados concordaram bem com os da literatura relacionados a experimentos para inativação isotérmica de esporos em purê de ervilha.

BHAMIDIPATI e SINGH (1996) e RAMASWAMY et al. (1996) usaram enzimas (peroxidase de origem vegetal e tripsina de pâncreas bovino, respectivamente) embebidas em partículas que foram tratadas termicamente num sistema de fluxo líquido para validar o processo da modelagem numérica. Os dois estudos apresentaram uma boa correspondência entre os valores experimentais e simulados para manutenção da atividade enzimática.

2.2. MODELAGEM DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS EM ALIMENTOS

O processamento térmico de alimentos é uma das técnicas de preservação mais importantes usadas na indústria de alimentos. O objetivo principal é inativar microrganismos que deterioram o alimento e, ou enzimas para obter um produto comercialmente estéril e com uma vida de prateleira razoável. Ao mesmo tempo, a maximização da retenção de fatores de qualidade deve ser atingida (WENG et al., 1991).

Segundo Lenz e Lund, citado por WENG et al. (1991), muitos métodos para cálculos de processos têm sido desenvolvidos, desde que Bigelow desenvolveu o “Método Geral” e Ball estabeleceu o Método Fórmula. A maioria dos métodos correntemente usada no processamento térmica está no grupo matemático.

Os métodos de cálculo de processos são geralmente divididos em duas classes: (1) O método Geral e (2) O método Fórmula. O método Geral integra os efeitos letais, por procedimentos de integração gráfica ou numérica, baseados em dados de tempo-temperatura, obtidos a partir de testes em alimentos processados sob condições de processamento comercial. Por outro lado, o método Fórmula, faz uso de parâmetros obtidos a partir de dados de penetração de calor juntamente com vários procedimentos matemáticos para integrar os efeitos letais (RAMASWAMY e SINGH, 1997).

2.2.1. Método Geral ou Gráfico

O método, como estabelecido originalmente, consiste num procedimento gráfico de integração dos efeitos letais do perfil de tempo-temperatura obtido a partir de testes em produtos sob condições de processamento. O uso do conceito da razão letal torna possível esse cálculo.

Os parâmetros exigidos por este método são: (1) dados cinéticos, como tempo de redução decimal (D) e valor da resistência térmica (z), relacionados a um microrganismo alvo, (2) a curva de penetração de calor do ponto frio ou outro local do produto e (3) o valor desejado da eficiência do tratamento térmico, representado por um binômio tempo vs. temperatura.

O cálculo de processo utilizando o método Geral é o mais preciso na determinação do valor de esterilização de processos térmicos. Os resultados do método Geral são bem específicos para o produto sob as condições empregadas para o teste. Extrapolações e generalizações devem ser evitadas ou feitas com extremo cuidado.

2.2.2. Método Fórmula de Ball

Este método é o mais simples, sendo a técnica mais usada no cálculo de processos. Muitas outras análises para processos térmicos usando certas variações do método Fórmula têm surgido, desde que o método foi publicado por Ball em 1921.

Conhecida uma curva de penetração de calor que represente o processo, é possível a partir do Método Fórmula estimar: (1) um novo tempo de processo térmico equivalente a um binômio de Tempo vs. Temperatura (F_{ref}); (2) o efeito letal do tratamento térmico; (3) novos processos para o mesmo produto em várias dimensões, já que usa dados de penetração de calor na forma de parâmetros e (4) novos processos, se existirem mudanças na temperatura média de aquecimento (T_r) ou na temperatura inicial do produto (T_i). O uso do método Fórmula para avaliação de processos é também mais rápido que o método Geral e tem sido muito bem utilizado no estudo dos efeitos de variações no processo.

De acordo com LENZ e LUND, (1977), existem pelo menos cinco métodos disponíveis para o cálculo da média de retenção de componentes sensíveis ao calor presente nos alimentos termicamente processados. Eles são: (1) média do método Fórmula (BALL e OLSON, 1957); (2) média do método Fórmula melhorado (JEN et al., 1971); (3) método do grupo adimensional (HAYAKAWA, 1969); (4) método de diferenças finitas (TEIXEIRA et al., 1969); e (5) média do método Geral (COHEN e WALL, 1971).

O método de BALL e OLSON (1957) e JEN et al. (1971) utiliza relações empíricas para descrever temperatura como função do tempo de processo. O método de COHEN e WALL (1971) exige curvas de penetração de calor experimental em várias posições na substância. O método de HAYAKAWA (1969) e TEIXEIRA et al. (1969) emprega equações fundamentais de transferência de calor por condução.

Apesar desses métodos serem aplicados na indústria de alimentos, seu uso tem sido limitado, no que diz respeito à nova tecnologia, como processamento contínuo de alimentos em partículas. Mesmo sob condições de processamento clássico, tem sido difícil estabelecer um processo adequado,

devido ao comportamento complexo dos alimentos durante o aquecimento (PFLUG e ODLAUG, 1978).

2.3. CINÉTICA DE MORTE MICROBIANA

O primeiro passo antes de se estabelecer processos térmicos é a identificação do microrganismo/enzima alvo ou do mais resistente ao calor. O próximo passo é a avaliação da resistência térmica do microrganismo ou da enzima, devendo ser determinada sob as condições que, normalmente, prevalecem no produto.

Cálculos de processamentos térmicos convencionais assumem que a resistência térmica de microrganismos, sob condições de variação de temperatura, pode ser predita pelo seu comportamento em temperaturas constantes. Essa hipótese não tem sido verdadeira, com relação a um número de bactérias, incluindo *Salmonella typhimurium* (MACKEY e DERRICK, 1987) e *Listeria monocytogenes* (QUINTAVALLA e CAMPANINI, 1991). A resistência dessas bactérias pode aumentar durante processos com baixas taxas de aquecimento.

Por outro lado, de acordo com BELLARA et al., (1999), as taxas de aquecimento, tipicamente empregadas nos processos por condução de calor em alimentos, são suficientemente elevadas, não permitindo que células vegetativas tenham tempo para aumentar suas resistências ao calor.

2.3.1. Curva de sobreviventes e tempo de redução decimal (D)

Resultados publicados sobre a inativação térmica de microrganismos geralmente mostram que eles seguem uma reação de primeira ordem, indicando uma morte em escala logarítmica. A taxa de inativação microbiana é geralmente definida em termos do tempo de redução decimal (D). O valor de D é definido como o tempo de aquecimento necessário para destruição de 90% da população microbiana existente numa dada temperatura de referência, sendo:

$$D = (t_2 - t_1) / [\log(Ca) - \log(Cb)] \quad (1)$$

em que, Ca e Cb representam o número de sobreviventes seguindo o aquecimento para os tempos t_1 e t_2 minutos, respectivamente.

2.3.2. Curva do tempo de morte térmica

Os valores de z, podem ser obtidos pela curva do tempo de morte térmica, resultante do gráfico do log de D ou F vs. Temperatura, normalmente, uma relação linear. O valor de z é a variação de temperatura, para que o valor de D ou F mude por um fator de 10.

O valor de z está diretamente relacionado com o tipo de microrganismo e o meio em que o microrganismo está inoculado.

Uma estimativa mais precisa do valor de z, é obtida pela regressão linear dos dados do gráfico. O valor de z estimado é o negativo do inverso da inclinação da curva linearizada.

$$z = (T_2 - T_1) / [\log(D_1) - \log(D_2)] \quad (2)$$

A partir desta relação, obtemos a equação 3 que é definida como modelo de Bigelow:

$$D_1 = D_2 10^{\frac{T_2 - T_1}{z}} \quad (3)$$

em que, D_1 e D_2 são os valores de D nas temperaturas T_1 e T_2 , respectivamente.

Em microbiologia de alimentos, um outro termo importante é denominado, tempo de morte térmica (F_t^z). O valor de F é definido como o tempo, numa faixa de temperatura, necessário para destruição de uma carga microbiana especificada. Comparando-se o tempo de morte térmica (F_t^z), com o valor de D, pode-se facilmente reconhecer que:

$$F_t^z = D (\log N_0 - \log N_F) \quad (4)$$

em que N_0 é o número inicial e N_F o número final de microrganismos, ou:

$$F_t^z = nD \quad (5)$$

onde n é o número de reduções decimais desejados para o processo.

2.3.3. Razão Letal

A razão letal (L) é definida como a razão entre o tempo de morte microbiana em minutos, na temperatura de referência (T_{ref}) e o tempo de morte em qualquer temperatura (T).

A equação da curva de morte térmica, na forma exponencial, usando o modelo empírico proposto por Bigelow pode ser expressa como (PFLUG, 1990):

$$\frac{F_{ref}}{F_T} = 10^{(T-T_{ref})/z} \quad (6)$$

em que, F_{ref} é o valor de esterilização do processo térmico na temperatura de referência (min), F_T é o valor de esterilização do processo na temperatura T (min), T é a temperatura do produto, T_{ref} é a temperatura de referência arbitrária.

Desde que, o lado esquerdo da equação acima é uma definição da razão letal (L), então:

$$L = 10^{(T-T_{ref})/z} \quad (7)$$

A razão letal (L), apesar de ser desenvolvida usando-se os valores de F , é função apenas: (1) da diferença entre a temperatura do produto T e a temperatura de referência T_{ref} e (2) do valor de z .

O tempo de morte térmica (F_0) para processos de esterilização, em que a temperatura de referência (T_{ref}) é 121,1 °C é calculado pela integração numérica dos efeitos letais ao longo do tempo de processo, como segue abaixo:

$$F_0 = \int_0^t L dt \quad (8)$$

em que, F_0 é o valor de esterilização do processo térmico (min) a 121,1 °C, L é a razão letal e t é o tempo do processamento térmico.

Para tratamentos reais em que o alimento passa por um processo transiente, deverá ser possível o uso deste conceito para integrar os efeitos letais através de várias combinações de tempo-temperatura. Além disso, com respeito à situação do processamento, o valor de F , pode ser expresso em relação a uma localização específica (normalmente o centro geométrico) ou qualquer outra localização arbitrariamente escolhida ou ainda pode ser a soma dos valores de F para todos os pontos dentro do container ou do produto. Em termos microbiológicos, a garantia da destruição microbiana mínima no centro térmico é de extrema importância, enquanto que do ponto de vista de qualidade, é desejável minimizar a inativação total através do produto (RAMASWAMY e SINGH, 1997).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório do “United States Department of Agriculture” (USDA-ARS) do Departamento de Food Science, na North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, EUA.

Os pepinos utilizados neste estudo foram provenientes de Mount Olive Pickle Company e Farmer’s Market (a maioria deles do distrito de Johnson). Todos os frutos estavam em boas condições e livres de danos mecânicos.

A determinação da localização dos microrganismos em pepinos frescos foi conduzida, como uma etapa do processo de otimização para redução da carga microbiana no fruto.

Em seguida, um modelo computacional combinando as equações de transferência de calor e de cinética de morte microbiana foi adaptado para simular a localização da microbiota natural em pepinos e o tempo do processo de branqueamento necessário à redução da carga microbiana.

3.1. LOCALIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS DENTRO DOS PEPINOS

Testes preliminares, com o objetivo de determinar a distribuição dos microrganismos nos pepinos, mostraram que para os frutos de tamanhos 1B (até 27mm de diâmetro), 2B (diâmetros 35 a 38mm) e 3B (diâmetros de 44 a 54mm), microrganismos não foram detectados numa faixa de 5 a 7 mm de

profundidade a partir da superfície. Portanto, para posterior experimentação, os pepinos de tamanho 3B foram selecionados para confirmação destes testes, devido à conveniência no uso de um vazador durante a amostragem interna.

O procedimento empregado para a obtenção do diâmetro externo do pepino e a realização das análises microbiológicas são descritos a seguir.

3.1.1. Determinação do diâmetro do pepino

Um paquímetro digital (Digimatic, Model N°. CD-S6``CP, Mitutoyo Co., Japão) com precisão de 0,01mm foi usado para medidas do diâmetro das partes: central e regiões próximas à extremidade do caule e da flor do pepino. A Figura 1 ilustra um pepino com a indicação das regiões aproximadas onde os três diâmetros foram medidos.

O experimento foi conduzido em 10 repetições, com 20 pepinos em cada repetição, entre Setembro e Outubro de 1999.

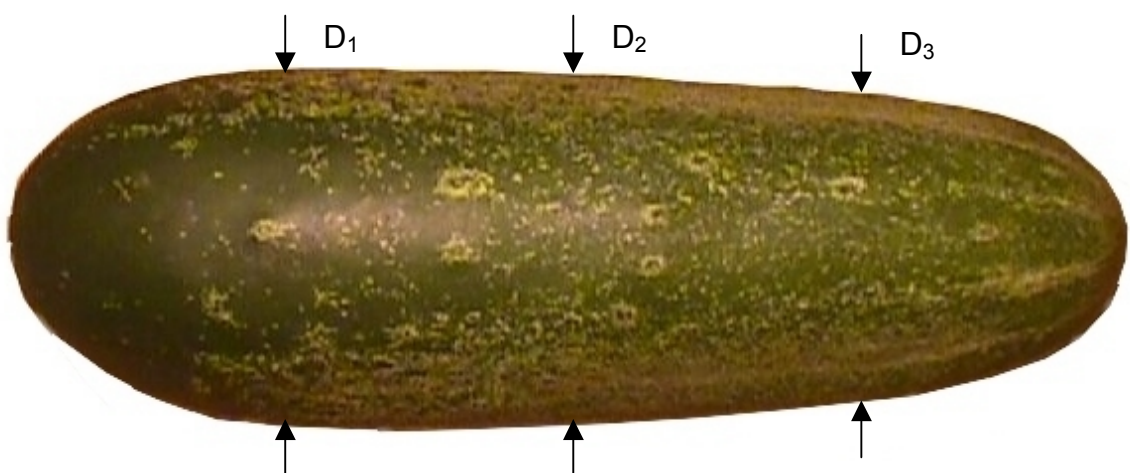


Figura 1. Locais aproximados das medidas dos diferentes diâmetros do pepino para as regiões próximas ao caule (D_1), centro (D_2) e flor (D_3).

3.1.2. Localização dos microrganismos nas diferentes partes do fruto

a) Parte central do pepino

Após a determinação das dimensões dos diâmetros, seis pepinos, selecionados aleatoriamente e lavados em água corrente por, aproximadamente, 15 segundos, foram preparados para realização das análises microbiológicas.

As duas extremidades do pepino foram cortadas e descartadas, usando uma faca esterilizada. O corte foi bem superficial, a faca não passou por toda a extensão do fruto. A parte central do pepino foi usada para determinar a profundidade em que estariam localizados os microrganismos.

Um vazador de 38mm de calibre, construído na oficina de mecânica do Departamento de Agricultura e Biologia da North Carolina State University (NCSU), foi esterilizado em autoclave e usado para remover a parte interna do pepino.

A parte interna (endocarpo), removida do fruto foi, em seguida, colocada num saco plástico com filtro, tipo "Stomacher filter bag" (SFB 0410, Spiral biotech) e homogeneizado em alta velocidade por 2 minutos no homogeneizador de pistões, "Stomacher" (Model 400, Spiral Biotech, Seward, England).

A parte externa do fruto foi colocada em uma jarra estéril e misturada com a mesma quantidade de água peptonada 0,1% num liquidificador (Waring Blender, Dynamic Products Corp., New Hartford, CT), em alta velocidade por 2 minutos. Em seguida, a amostra foi homogeneizada no homogeneizador de pistões, da mesma maneira que a parte central do fruto.

Para as duas regiões (interna e externa) do fruto, foram realizadas contagens para aeróbios mesófilos, enterobactérias e esporos mesófilos aeróbios.

b) Extremidades do pepino

As extremidades dos pepinos frescos de tamanho 3B foram cortadas usando uma faca esterilizada. O tecido interno das duas extremidades (aproximadamente 20 gramas) foi removido de forma asséptica usando uma

espátula, sendo colocado separadamente no filtro e depois homogeneizado seguindo o mesmo procedimento que foi descrito acima para a seção central do pepino para determinação de aeróbios mesófilos.

A distância da superfície para o centro da amostra removido foi medida usando um paquímetro digital (Digimatic, Model No. CD-S6`CP, Mitutoyo Co., Japão) com precisão de 0,01 mm.

Esta parte do experimento foi conduzida em seis repetições, analisando dois pepinos para cada repetição (total de 12 pepinos).

c) Fruto inteiro

Os frutos, todos em boas condições físicas, depois de serem lavados, tiveram as extremidades cortadas usando uma faca esterilizada e foram colocadas em diferentes jarras esterilizadas. A Figura 2 ilustra as três partes do fruto (parte central e as duas extremidades). O mesmo procedimento para preparação das amostras para análises microbiológicas da parte externa do fruto foi realizado. A contagem de enterobactérias não foi realizada neste caso.

O experimento foi conduzido com dois pepinos em cada repetição, num total de quatro repetições (oito pepinos para o experimento).

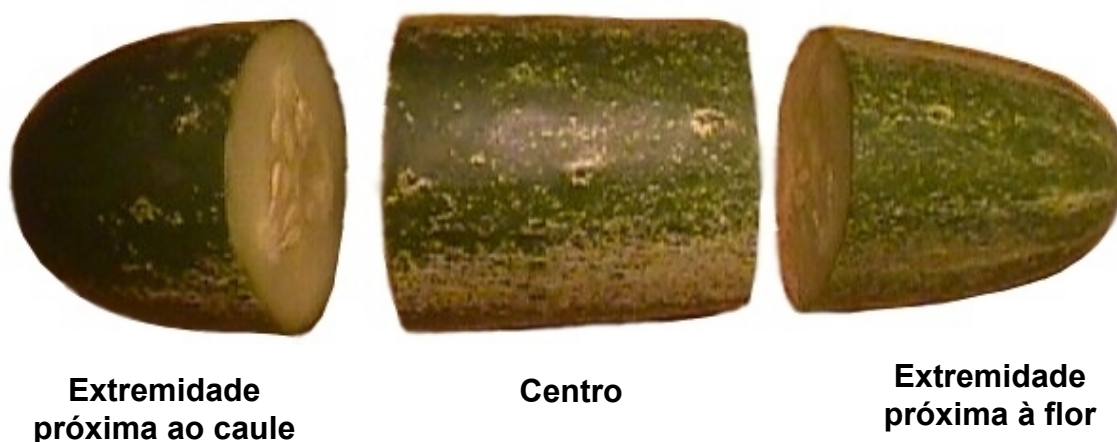


Figura 2. Corte transversal do pepino mostrando a região central e as extremidades próximas do caule e da flor.

3.1.3. Contagem da microbiota contaminante

A contagem para aeróbios mesófilos nas amostras de pepinos foi realizada em Agar padrão para contagem (PCA) (Difco Laboratories, Detroit, MI), seguindo o procedimento padrão (SWANSON et al., 1992).

Enterobactérias foram cultivadas em Agar Bile Vermelho Violeta, adicionado de 1% de glicose (VRBG) (VRB Agar, Difco Laboratories, Detroit, MI, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) segundo FLEMING et al. (1992).

Um plaqueador automático tipo “Spiral Plate” (Autoplate 4000, Spiral biotech, Bethesda, MD) foi empregado para plaquear as amostras em PCA e VRBG. As amostras foram incubadas a 30°C por 20 a 24 horas e um contador automático de colônias tipo “Protos Colony Counter” (Synoptics Ltd., Cambridge, England) foi usado para determinar o número de colônias.

Cartões de petri film (3M) para contagem de aeróbios mesófilos e enterobactérias foram usadas quando se previu concentrações celulares menores que 5×10^2 UFC/ml, como por exemplo, de amostras do interior do fruto. Essas amostras foram incubadas a 30 °C por 48 horas.

O caldo de glicose e peptona (TGE) (Difco Laboratories, Detroit, MI) foi empregado como meio de crescimento para esporos aeróbios mesófilos, seguindo o procedimento de STEVENSON e SEGNER, 1992 do manual, com uma pequena modificação feita por SCHUMAN et al. (1997). Um volume de 25 ml de meio TGE foi colocado em 6 tubos plásticos de 50 ml para cada amostra (# 430829, Corning Incorporated). Três tubos adicionais foram utilizados como controle. Os tubos foram inoculados com 1 ml e 0,1 ml de amostra em triplicata. Em seguida, foram agitados gentilmente para dispersar a amostra pelo meio. Os tubos foram transferidos imediatamente para um banho-maria com circulação (MGW Lauda RC20, Model B-2) ajustado para 80 °C e mantido por 30 min. O resfriamento foi feito com água de torneira, assegurando-se que a temperatura não ficasse abaixo do ponto de solidificação do meio. Os tubos foram transferidos para um banho a 45 °C após a etapa de resfriamento e mantido por um período não superior a 10 min. Empregando-se a técnica de “pour plate”, as amostras foram transferidas para placas de petri estéreis (#

0875713, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) resfriadas em seguida. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas.

A contagem das colônias foi realizada na superfície e sub-superfície do meio de cultura. A média do número de colônias no grupo de três placas representou o número de esporos mesófilos aeróbios por grama.

3.2. MODELO DE TRANSFERÊNCIA DE CALOR E CINÉTICA DE MORTE DE MICRORGANISMOS PARA BRANQUEAMENTO DE PEPINOS

Tentativas prévias com o objetivo de reduzir o número de microrganismos em pepinos frescos para pickles, por processos de lavagem ou usando um agente sanitizante à base de cloro, resultou tipicamente na redução de somente um ou dois ciclos log na microbiota de aeróbios mesófilos (REINA et al., 1995).

Por outro lado, o branqueamento de pepinos tem mostrado ser um método efetivo de redução do número de células da população de aeróbios mesófilos. O desenvolvimento de processos de branqueamento brandos, para pickles de pepinos, pode portanto, evitar os problemas observados ao se utilizar agentes sanitizantes e químicos. Além disso, não foi observada degradação efetiva sobre a qualidade sensorial em pepinos, após serem submetidos a processos de branqueamento a 80 °C por 15 s (BREIDT et al., 1999).

3.2.1. Modelo de transferência de Calor

FASINA e FLEMING (1999) mostraram que durante o branqueamento de pepinos, a transferência de massa pode ser desprezada. O pepino foi aproximado para um cilindro finito. A razão entre o comprimento e o raio é menor que quatro, portanto, efeitos de extremidade podem estar presentes. Assim, a análise de transferência de calor, durante o branqueamento, levou em conta duas dimensões (r e λ). A equação de calor em coordenadas cilíndricas pode então ser expressa por:

$$\frac{1}{r} k \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial T}{\partial r} \right) + k \frac{\partial}{\partial \lambda} \left(\frac{\partial T}{\partial \lambda} \right) = \rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} \quad (9)$$

em que:

T = temperatura do pepino como uma função da posição e do tempo (°C);

t = tempo (s);

r = coordenada radial do ponto de interesse expresso como a distância medida ao longo do raio a partir do centro do pepino (m);

λ = coordenada axial do ponto de interesse expresso como a distância medida ao longo do comprimento a partir do centro do pepino (m);

k = condutividade térmica (W/m K);

c_p = calor específico (J/kg K);

ρ = massa específica (kg/m³);

As condições iniciais e de contorno para a equação (9) são:

$$T(r, \lambda, 0) = T_i = T_0; \quad (10)$$

$$\left. \frac{\partial T}{\partial r} \right|_{r=0} = 0; \quad (11)$$

$$\left. \frac{\partial T}{\partial \lambda} \right|_{\lambda=C/2} = 0; \quad (12)$$

$$-k \left. \frac{\partial T}{\partial r} \right|_{r=R} = h[T(R, t) - T_\infty] \quad \text{e} \quad (13)$$

$$-k \left. \frac{\partial T}{\partial \lambda} \right|_{\lambda=C} = h[T(C, t) - T_\infty] \quad (14)$$

em que h é o coeficiente de transferência de calor (W/m² K) e R e C são, respectivamente, o raio e o comprimento do pepino em metros.

As equações (11) e (12) foram escritas baseadas na hipótese de simetria do pepino e desta forma o perfil de temperatura também será simétrico em relação ao eixo. As superfícies de simetria foram tratadas como adiabáticas.

a) Propriedades Termofísicas

Os valores da condutividade térmica (k), calor específico (c_p) e coeficiente convectivo de transferência de calor (h) usados no grupo de equações acima foram 0,62 W/m K, 4,04 kJ/kg K e 1168 W/m² K, respectivamente. Estes valores foram determinados por FASINA e FLEMING (1999) e não são afetados pela temperatura numa faixa de 20 a 95 °C.

Propriedades físicas como massa, diâmetro, comprimento, volume e massa específica foram determinados para 16 pepinos. As dimensões para os três diâmetros do pepino (centro e extremidades do caule e da flor) foram determinadas utilizando um paquímetro digital. A massa do pepino foi obtida usando uma balança (Sartorius, laboratory LC 2200S) com precisão de 0,01 gramas.

A massa específica de cada pepino foi determinada pelo método do deslocamento de fluido, usando água como fluido. Um kitassato com abertura lateral foi usado. A água que saía pela lateral do frasco era pesada enquanto o pepino era colocado dentro do frasco. A massa específica do pepino foi calculada como segue:

$$\rho_p = \frac{m_p}{m_a} \rho_a \quad (15)$$

em que ρ_p , m_p , ρ_a e m_a são, respectivamente a massa específica do pepino (kg/m³), a massa do pepino (kg), a massa específica da água (kg/m³) e a massa de água coletada do kitassato (kg).

O procedimento foi repetido em 6 ocasiões diferentes no período de Outubro a Novembro de 1999. Em cada repetição foram utilizados 16 pepinos (12 para o branqueamento e 4 como testemunhas).

b) Desenvolvimento do Programa

De acordo com Teixeira e Shoemaker, citado por NICOLAI et al. (1995), soluções analíticas são disponíveis apenas para geometrias simples e condições de contorno menos complexas. Soluções numéricas por métodos de diferenças finitas e elementos finitos têm mostrado ser útil para a otimização de processos bem como para controle de processos em tempo real.

Em geral, no tratamento térmico de alimentos, a preocupação tem sido com a variação de temperatura no ponto frio. Entretanto, na presente situação a distribuição espacial e temporal da temperatura é necessária. Pela sua simplicidade o método das diferenças finitas, tem sido amplamente empregado para geometrias retangulares (MANSON et al., 1970; TUCKER e CLARK, 1990) e cilíndricas (TEIXEIRA et al., 1969; TUCKER e CLARK, 1990), sob várias condições de processamento. Este foi o método empregado para a solução da equação de calor.

O programa em linguagem FORTRAN, escrito por OLIVEIRA (1997) para problemas de transferência de calor em duas dimensões foi modificado para o propósito deste estudo. A técnica ADI (Alternating Direction Implicit) foi utilizada para codificar numericamente a equação (8).

c) Simulação numérica

A técnica ADI foi empregada para resolver a equação (9) e para determinar a distribuição de temperatura no pepino durante o processo de branqueamento (OLIVEIRA, 1997).

A discretização do domínio em diferenças finitas é mostrado na Figura 3. As equações em diferenças finitas usadas para obter a temperatura em cada nó para um sistema em duas dimensões estão apresentadas no Quadro 1.

O programa, desenvolvido para resolver a equação de difusão de calor é composto de um programa principal e 2 sub-rotinas que calculam a distribuição de temperatura transiente nos pepinos.

A temperatura de película é calculada a partir das condições de contorno no início do programa (equações 11 a 14).

A partir dos parâmetros de entrada e da distribuição inicial de temperatura o programa gera uma matriz $n \times n$, representando o sistema de equações em diferenças finitas para a grade utilizada na discretização. O sistema é então resolvido pelo processo de eliminação de Gauss, seguindo a técnica ADI, em que primeiramente o sistema é resolvido na direção λ para o tempo $t+\Delta t$ e a seguir na direção r para o instante $t+2\Delta t$.

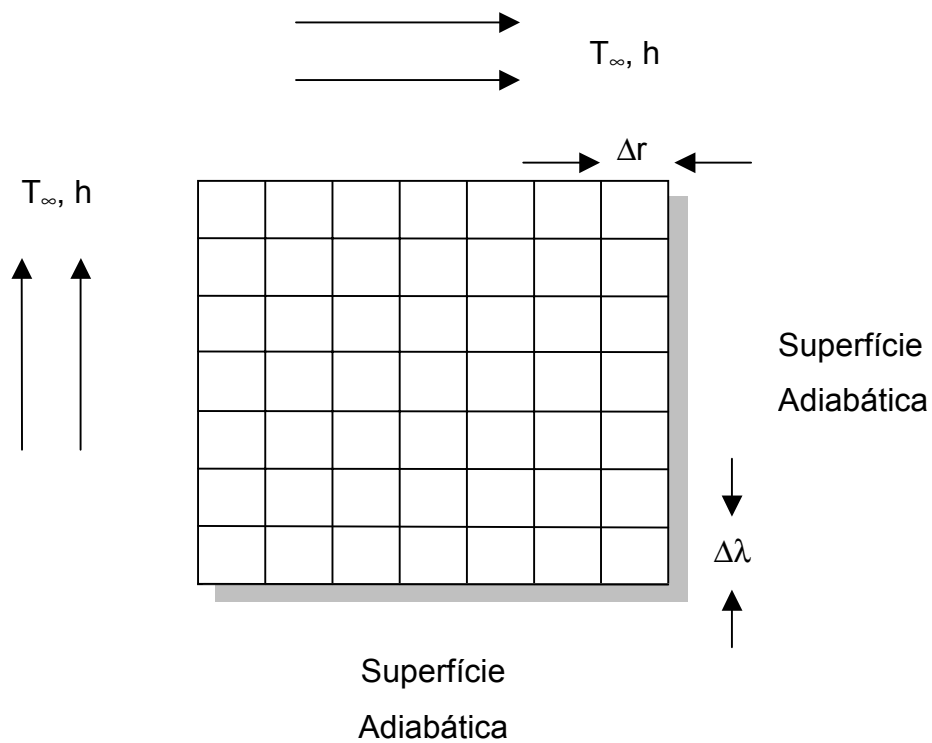


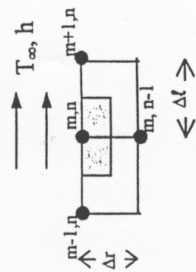
Figura 3. Discretização do domínio.

O ciclo é repetido até atingir as condições desejadas. A distribuição de temperatura no pepino durante o processo de branqueamento é obtida no final do processo de simulação pelo modelo.

Quadro 1. Equações em diferenças finitas para um cilindro

Nós	Equações
	$-a_{i+\Delta r} T_{m-1,n} + (2a+e)_{i+\Delta r} T_{m,n} - a_{i+\Delta r} T_{m+1,n} = c_i T_{m,n-1} - (c+d-e) T_{m,n} + d_i T_{m,n+1} \quad (\ell)$ $-c_{i+2\Delta r} T_{m,n-1} + (c+d+e)_{i+2\Delta r} T_{m,n} - d_{i+2\Delta r} T_{m,n+1} = a_{i+\Delta r} T_{m-1,n} - (2a-e)_{i+\Delta r} T_{m,n} + a_{i+\Delta r} T_{m+1,n} \quad (r)$ $a = \frac{N\Delta r^2}{\Delta \ell} k \quad c = (N-0.5)\Delta \ell k \quad d = (N+0.5)\Delta \ell k \quad e = \frac{N\rho c_p \Delta r^2 \Delta \ell}{\Delta t}$
	$-(a+b+e)_{i+\Delta r} T_{m,n} - b_{i+\Delta r} T_{m+1,n} = c_i T_{m,n-1} - (c+d-e) T_{m,n} + d_i T_{m,n+1} + a T_\infty \quad (\ell)$ $-c_{i+2\Delta r} T_{m,n-1} + (a+c+d+e)_{i+2\Delta r} T_{m,n} - d_{i+2\Delta r} T_{m,n+1} = -(b-e)_{i+\Delta r} T_{m,n} + b_{i+\Delta r} T_{m+1,n} + a T_\infty \quad (r)$ $a = 2N\Delta r^2 h \quad b = 2 \frac{N\Delta r^2}{\Delta \ell} k \quad c = (N-0.5)\Delta \ell k \quad d = (N+0.5)\Delta \ell k \quad e = \left(\frac{N\rho c_p \Delta r^2 \Delta \ell}{\Delta t} \right)$
	$-a_{i+\Delta r} T_{m-1,n} + (a+e)_{i+\Delta r} T_{m,n} = c_i T_{m,n-1} - (c+d-e) T_{m,n} + d_i T_{m,n+1} \quad (\ell)$ $-c_{i+2\Delta r} T_{m,n-1} + (c+d+e)_{i+2\Delta r} T_{m,n} - d_{i+2\Delta r} T_{m,n+1} = a_{i+\Delta r} T_{m-1,n} - (a-e)_{i+\Delta r} T_{m,n} \quad (r)$ $a = 2 \frac{N\Delta r^2}{\Delta \ell} k \quad c = (N-0.5)\Delta \ell k \quad d = (N+0.5)\Delta \ell k \quad e = \left(\frac{N\rho c_p \Delta r^2 \Delta \ell}{\Delta t} \right)$

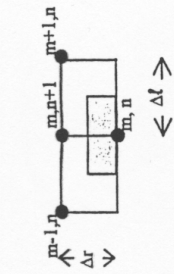
Quadro 1. Cont.



$$-a_{i+\Delta t} T_{m-1,n} + (2a+d+e)_{i+\Delta t} T_{m,n} - a_{i+\Delta t} T_{m+1,n} = c T_{m,n-1} - (c-e) T_{m,n} + d T_{\infty} \quad (\ell) \quad (19)$$

$$-c_{i+2\Delta t} T_{m,n-1} + (c+d+e)_{i+2\Delta t} T_{m,n} = a_{i+\Delta t} T_{m-1,n} - (2a-e)_{i+\Delta t} T_{m,n} + a_{i+\Delta t} T_{m+1,n} + d T_{\infty} \quad (r)$$

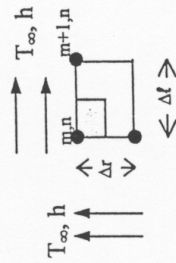
$$a = (N-0.25) \frac{\Delta r^2}{\Delta \ell} k \quad c = (N-0.5) \Delta \ell k \quad d = 2N \Delta \ell h \quad e = (N-0.25) \frac{\rho c_p \Delta r^2 \Delta \ell}{\Delta t}$$



$$-a_{i+\Delta t} T_{m-1,n} + (2a+e)_{i+\Delta t} T_{m,n} - a_{i+\Delta t} T_{m+1,n} = -(d-e) T_{m,n} + d T_{m,n+1} \quad (\ell) \quad (20)$$

$$(d+e)_{i+2\Delta t} T_{m,n} - d_{i+2\Delta t} T_{m,n+1} = a_{i+\Delta t} T_{m-1,n} - (2a-e)_{i+\Delta t} T_{m,n} + a_{i+\Delta t} T_{m+1,n} \quad (r)$$

$$a = \frac{\Delta r^2}{2\Delta \ell} k \quad d = 2\Delta \ell k \quad e = \frac{\rho c_p \Delta r^2 \Delta \ell}{2\Delta t}$$

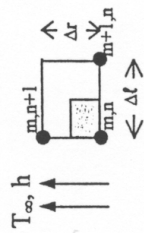


$$-(a+b+d+e)_{i+\Delta t} T_{m,n} - b_{i+\Delta t} T_{m+1,n} = c T_{m,n-1} - (c-e) T_{m,n} + (a+d) T_{\infty} \quad (\ell) \quad (21)$$

$$-c_{i+2\Delta t} T_{m,n-1} + (a+c+d+e)_{i+2\Delta t} T_{m,n} = -(b-e)_{i+\Delta t} T_{m,n} + b_{i+\Delta t} T_{m+1,n} + (a+d) T_{\infty} \quad (r)$$

$$a = (N-0.25) h \Delta r^2 \quad b = (N-0.25) \frac{\Delta r^2}{\Delta \ell} k \quad c = (N-0.5) \Delta \ell k \quad d = N \Delta r \Delta \ell h \quad e = (N-0.25) \frac{\rho c_p \Delta r^2 \Delta \ell}{2\Delta t}$$

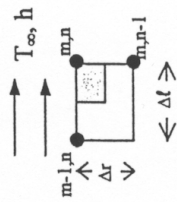
Quadro 1. Cont.



$$(a+b+e)_{i+\Delta t} T_{m,n} - b_{i+\Delta t} T_{m+1,n} = -(d-e)_{i+\Delta t} T_{m,n} + d_{i+\Delta t} T_{m,n+1} + a T_{\infty} \quad (\ell)$$

$$(a+d+e)_{i+2\Delta t} T_{m,n} - d_{i+2\Delta t} T_{m,n+1} = -(b-e)_{i+2\Delta t} T_{m,n} + b_{i+2\Delta t} T_{m+1,n} + a T_{\infty} \quad (\tau)$$

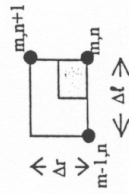
$$a = \frac{1}{2} h \Delta r^2 \quad b = \frac{\Delta r^2}{2 \Delta l} k \quad d = \Delta l k \quad e = \frac{\rho c_p \Delta r^2 \Delta l}{4 \Delta t}$$



$$-a_{i+\Delta t} T_{m-1,n} + (a+d+e)_{i+\Delta t} T_{m,n} = c_{i+\Delta t} T_{m,n-1} - (c-e)_{i+\Delta t} T_{m,n} + d T_{\infty} \quad (\ell)$$

$$-c_{i+2\Delta t} T_{m,n-1} + (c+d+e)_{i+2\Delta t} T_{m,n} = a_{i+2\Delta t} T_{m-1,n} - (a-e)_{i+2\Delta t} T_{m,n} + d T_{\infty} \quad (\tau)$$

$$a = (N - 0.25) \frac{\Delta r^2}{\Delta l} k \quad c = (N - 0.5) \Delta l k \quad d = N h \Delta l \Delta r \quad e = (N - 0.25) \frac{\rho c_p \Delta r^2 \Delta l}{2 \Delta t}$$



$$-a_{i+\Delta t} T_{m-1,n} + (a+e)_{i+\Delta t} T_{m,n} = -(d-e)_{i+\Delta t} T_{m,n} + d_{i+\Delta t} T_{m,n+1} \quad (\ell)$$

$$(d+e)_{i+2\Delta t} T_{m,n} - d_{i+2\Delta t} T_{m,n+1} = a_{i+2\Delta t} T_{m-1,n} - (a-e)_{i+2\Delta t} T_{m,n} \quad (\tau)$$

$$a = \frac{\Delta r^2}{2 \Delta l} k \quad d = \Delta l k \quad e = \frac{\rho c_p \Delta r^2 \Delta l}{2 \Delta t}$$

3.2.2. Modelo da cinética de morte microbiana

A equação de transferência de calor descrita anteriormente (equação 9) foi combinada com a equação para cinética de morte microbiana (equação 25), para determinar o tempo de branqueamento necessário para reduzir a população de aeróbios mesófilos nos pepinos em 99% (2-log). Assumiu-se que a localização dos microrganismos fosse uniformemente distribuída.

O tempo de morte térmica do início do processo de branqueamento até o tempo t para qualquer localização r foi calculado com segue:

$$F_{\text{calc}}|_r = \int_0^t L_r dt \Big|_r = \int_0^t 10^{(T-T_{\text{ref}})/z} dt \Big|_r \quad (25)$$

- F_{calc} = Tempo de morte térmica calculado a partir da distribuição de temperatura no pepino (min);
- L = Razão letal;
- T = Temperatura como função da posição e tempo, $T(r,t)$;
- T_{ref} = Temperatura de referência (52°C);
- z = Variação de temperatura em Kelvin ou em graus Celsius (ΔT) para uma mudança no valor de F_t^z ou D por um fator de 10.

A cada iteração, o modelo calcula F_{calc} para cada posição (ou nó dentro da rede nodal). Para o tempo t , os valores de F_{calc} para todas as posições são somados e comparados com o tempo de morte térmica necessário (F_t^z) como calculado abaixo:

$$F_t^z = D_{\text{ref}} * \text{Log}(N_0 / N) \quad (26)$$

- F_t^z = Tempo de morte térmica, necessário para redução de aeróbios mesófilos em 2-log;
- N_0 = Número inicial estimado para microbiota de aeróbios mesófilos;

- N = Número final desejado para microbiota de aeróbios mesófilos após processo térmico;
- $\text{Log}(N_0/N)$ = Número de redução necessária, em log, para o processo térmico;
- D_{ref} = Tempo necessário para reduzir 90% da microbiota de aeróbios mesófilos na temperatura de referência (52°C).

O Quadro 2 apresenta os parâmetros de entrada necessários para o programa:

A iteração é conduzida até o valor de F_{calc} ser igual ou maior que o valor do F_t^z . Em seguida, o programa fornece os seguintes dados de saída como resultado:

O tempo de branqueamento necessário para reduzir o número desejado de microrganismos.

A profundidade da localização dos microrganismos a partir da superfície do pepino.

Os parâmetros utilizados nas equações para cinética de morte da microbiota natural do pepino foram obtidos por BREIDT et al. (1999), onde os valores de D_{ref} a 52 °C e z para a população de aeróbios mesófilos foram de 4,5 min e 7,8 °C, respectivamente. A temperatura de referência (T_{ref}) utilizada foi de 52 °C.

O efeito do tempo de resfriamento na inativação dos microrganismos após o branqueamento foi considerado desprezível. Para a redução de 2-log na microbiota de aeróbios mesófilos, o tempo de aquecimento das amostras não foi suficiente para um aumento significativo da temperatura nas regiões mais internas do pepino. Portanto, o resfriamento após o tratamento térmico, ocorreu de forma quase que instantânea.

O fluxograma do modelo computacional combinando as equações de transferência de calor e de cinética de morte microbiana é apresentado na Figura 4.

Quadro 2. Dados de entrada do programa computacional

Parâmetros	Símbolo	Valores
Temperatura inicial do pepino	T_i	20 °C
Temperatura do banho	T_f	60, 80, 90 °C
Massa específica do pepino	ρ	980 Kg/m ³
Incremento na direção radial	Δr	0.62875x10 ⁻³ m
Incremento na direção axial	$\Delta \lambda$	7,0x10 ⁻³ m
Condutividade Térmica	k	0,62 W/m
Calor específico	c_p	4,04 kJ/kg
Coefficiente de transferência de calor	h	1168 W/m ² K
Intervalo temporal	Δt	0,1s
Diâmetro médio	d	50,3x10 ⁻³ m
Comprimento médio	C	140,0x10 ⁻³ m
Temperatura de referência	T_{ref}	52 °C
Tempo de redução decimal	Dref	4,5 min
Resistência térmica microbiana	z	7,8 °C
Número inicial da microbiota	N_0	100000 UFC/g
Número final da microbiota	N_f	1000 UFC/g

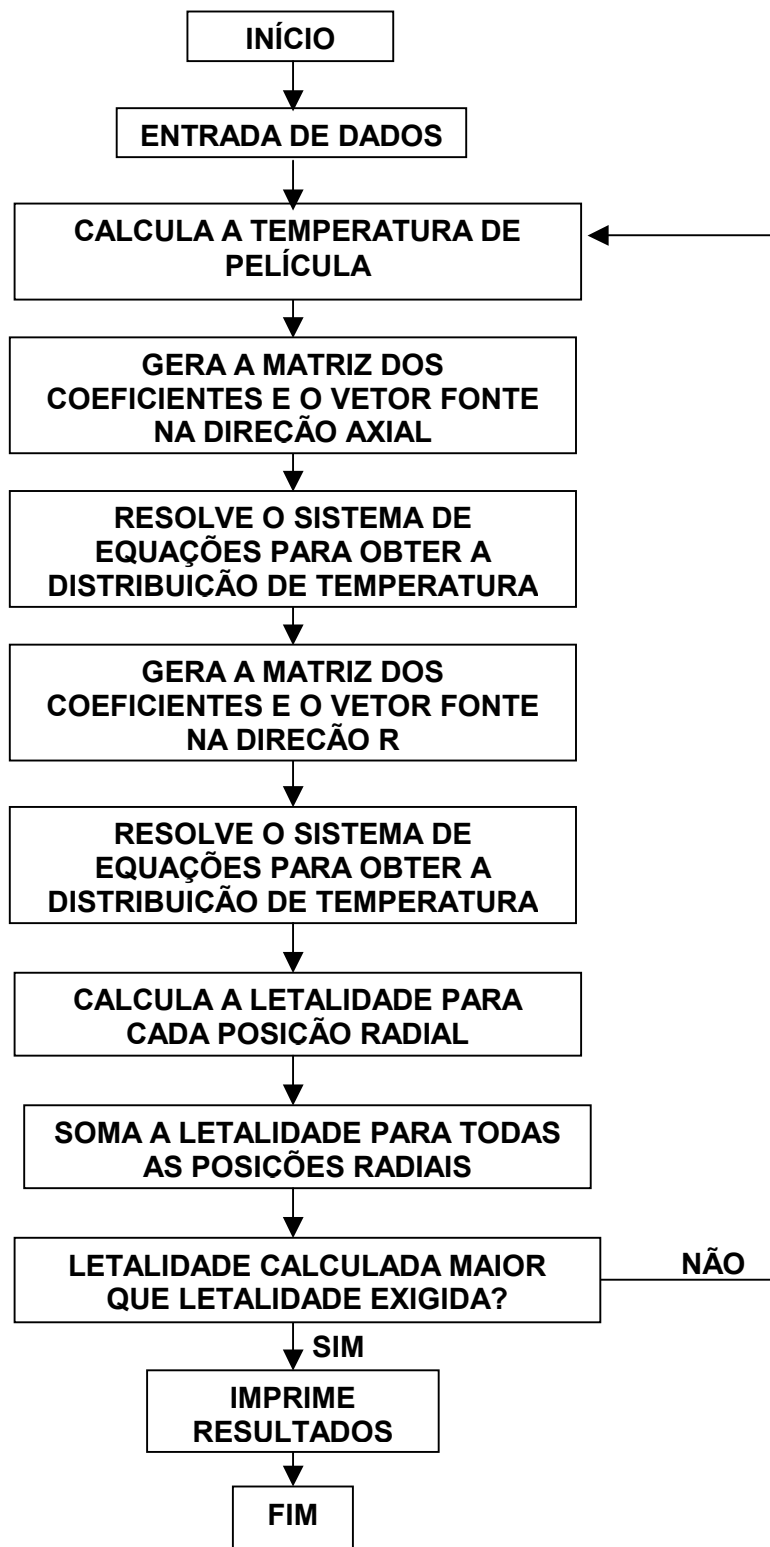


Figura 4. Fluxograma geral do modelo de transferência de calor – cinética de morte microbiana (TCCMM).

3.2.3. Validação do modelo

a) Processo de Branqueamento:

O tempo exigido para branqueamento foi estimado pelo modelo TCCMM baseando-se na redução de 2-log da microbiota de aeróbios mesófilos presente nos pepinos.

Os pepinos foram lavados em água corrente antes do processo de branqueamento. Quatro pepinos foram branqueados em banho-maria com os seguintes tratamentos em água circulante: 60 °C por 112,5 s, 80 °C por 12,5 s e 90 °C por 6,5 s. Além disso, quatro pepinos não foram branqueados e foram usados como controle no estudo.

Depois do branqueamento, cada pepino foi colocado dentro de uma jarra estéril e resfriados usando água peptonada 0,1% gelada (mesmo peso do pepino). O pepino foi triturado e homogeneizado num liquidificador (Waring Blender, Dynamic Products Corp. New Hartford, CT) em alta velocidade por 2 minutos. Em seguida, aproximadamente 200 ml da amostra foram transferidas para um saco plástico com filtro tipo “stomacher filter bag” (SFB 0410, Spiral biotech) e processado em alta velocidade por 1 minuto no homogeneizador de pistões (“Stomacher”, model 400, Spiral Biotech, Seward, England).

Amostras em duplicatas de 5 ml cada foram colocadas em tubos de polipropileno (# 430791, Corning Incorporated, NY) e mantidas em gelo para contagem de esporos aeróbios mesófilos e aeróbios mesófilos.

b) Contagem de microrganismos

A contagem padrão de aeróbios mesófilos em amostras de pepinos foi realizada em PCA (Difco Laboratories, Detroit MI) seguindo o procedimento para contagem padrão de aeróbios mesófilos (SWANSON et al. 1992).

O plaqueamento das amostras foi realizado em contador automático de colônias tipo “Spiral Plate” (Autoplate 4000, Spiral biotech, Bethesda, MD). As amostras foram incubadas a 30°C e contadas depois de 20 a 24 horas, usando um contador automático tipo “Protos Colony Counter” (Synoptics Ltd., Cambridge, England).

Cartões de petri film (3M) foram utilizados para enumerar aeróbios mesófilos, quando o número de células era menor que 5×10^2 CFU/ml. As amostras foram incubadas a 30 °C por 48 horas.

TGE (Difco Laboratories, Detroit MI) foi o meio de cultura usado para o crescimento de esporos mesófilos aeróbios.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. LOCALIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS NO FRUTO

A localização dos microrganismos e a distribuição destes, nas três regiões distintas do pepino, foram determinadas.

A determinação do diâmetro médio do pepino foi necessária para se definir a localização microbiana.

Além desse parâmetro, outras propriedades físicas do pepino também foram medidas e utilizadas como dados de entrada para o modelo computacional.

4.1.1. Parâmetros e propriedades físicas do pepino

Foram utilizados 200 pepinos para a obtenção de médias das características geométricas e das propriedades físicas necessárias para a simulação e condução da parte experimental.

O Quadro 3 apresenta os valores médios determinados para a massa, comprimento, diâmetros (regiões do caule, centro e da flor), volume e massa específica com seus respectivos coeficientes de variância.

Quadro 3. Medida das propriedades físicas em pepinos de tamanho 3B

Medidas Físicas	Valor Médio	Coeficiente de Variância (%)
Massa (g)	230,84	9,16
Comprimento (mm)	140,18	5,01
Diâmetro 1 (mm)^a	52,85	3,76
Diâmetro 2 (mm)^b	50,14	5,36
Diâmetro 3 (mm)^c	47,82	4,23
Média do diâmetro (mm)	50,27	3,45
Volume (ml)	236,49	9,38
Massa específica (g/ml)^d	0,98	1,69

^a Medida do diâmetro na região central do pepino;

^b Medida do diâmetro próximo à extremidade do caule do pepino;

^c Medida do diâmetro próximo à extremidade da flor do pepino.

^d Valor calculado a partir das medidas da massa e volume do pepino;

4.1.2. Localização dos microrganismos no pepino

Neste estudo, não foram detectadas bactérias (aeróbios mesófilos e enterobactérias) no interior da parte central dos pepinos. Entretanto, microrganismos foram encontrados no interior das extremidades do caule (aproximadamente 10^2 UFC/g) e da flor (aproximadamente 10^3 UFC/g), numa profundidade de 14 mm e 12 mm, respectivamente e com uma frequência de 8,33% num total de 24 observações.

Uma das hipóteses para explicar a presença dos microrganismos no interior do pepino é que estes entrariam pelas extremidades da flor do pepino, possivelmente durante o período de desabrochamento das flores (SAMISH e DIMANT, 1957).

Um estudo anterior mostrou que bactérias foram encontradas dentro do tecido do pepino e no sulco extraído de dentro do fruto (SAMISH e DIMANT, 1959). Outros estudos, também mostraram que as bactérias podem atingir o

interior do pepino através de estômatos (DAESCHEL e FLEMING, 1981). Este fenômeno pode ocorrer durante processos de trocas gasosas (DAESCHEL e FLEMING, 1981), ou durante o resfriamento com água em que existe um diferencial significativo de temperatura entre a temperatura inicial do fruto e a água fria do resfriamento (REINA et al., 1995).

A Figura 5 ilustra a parte externa dos pepinos de tamanhos 3B ($6 \text{ mm} \pm 1$ de profundidade). A contagem para aeróbios mesófilos superficiais variou entre 10^4 e 10^5 UFC/g e para enterobactérias entre 10^3 e 10^4 UFC/g. Os valores médios com o respectivo desvio padrão (D.P) estão apresentados no Quadro 4. As amostras referentes ao interior do fruto, não foi detectada a presença de bactérias. Os números representam médias de 58 observações para aeróbios mesófilos, 50 para enterobactérias e 60 para esporos aeróbios mesófilos.

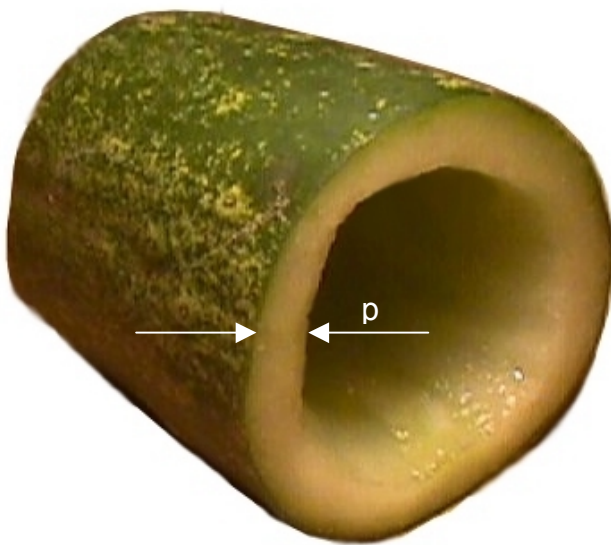


Figura 5. Corte transversal da região central do pepino com o endocarpo removido.

Em que p é a profundidade a partir da superfície do pepino ($6 \text{ mm} \pm 1$), em que foi detectada a presença de bactérias.

Quadro 4. Localização dos microrganismos na parte central em pepinos de tamanho 3B

Posição	Aeróbios Mesófilos	Enterobactérias	Esporos Aeróbios Mesófilos
Interna	<10 ^a	<10 ^a	<10 ^a
Superficial^b	5,00 (±0,53)	3,95 (±0,72)	2,41 (±0,39)

^a Número máximo detectável usando Petri film, número de microrganismos expresso em UFC/g.

^b Número de microrganismos expresso em log UFC/g.

Esses resultados concordam com os determinados por DAESCHEL et al. (1985), observando que a entrada de bactéria era preferencialmente através da superfície da casca devido à presença de um número maior de bactérias na área da casca e um número cada vez menor em direção ao interior do fruto.

4.1.3. Distribuição da microbiota natural no pepino

Este estudo foi conduzido para verificar a possibilidade de existência de diferentes concentrações de microrganismos nas três partes do pepino fresco (extremidades próximas ao caule e da flor, e parte central).

Em pepinos frescos, os resultados da análise de variância dos dados mostrados (Quadro 5) indicaram que não existe diferença significativa no número de aeróbios mesófilos em relação às partes no fruto ($P > 0,05$). A distribuição, praticamente homogênea, destas bactérias em pepinos antes de serem fermentados em salmoura, acentua ainda mais o efeito da salmoura e as conseqüentes trocas gasosas, que ocorrem durante o processo de fermentação, sobre a posterior localização dos microrganismos no fruto.

Estudos prévios indicaram presença de maior concentração de microrganismos na parte central dos pepinos fermentados, associando-se à maior freqüência de estômatos nesta região comparada com as extremidades do caule e da flor (DAESCHEL et al., 1985; SMITH e FLEMING, 1979).

Os valores das médias para a contagem de esporos aeróbios mesófilos foram balanceados devido ao número diferente de observações para as diferentes partes do fruto. Foi encontrada uma diferença significativa ao comparar pelo teste t, a parte central e a extremidade da flor do fruto ($P < 0,05$). O teste t para comparações de médias, por ser um teste mais liberal, pode detectar menores diferenças mais facilmente. Portanto, do ponto de vista prático, essa diferença em termos de valor absoluto pode ser considerada não significativa.

Quadro 5. Distribuição microbiana em diferentes partes do pepino inteiro

Partes do Pepino	Aeróbios Mesófilos *	Esporos Aeróbios Mesófilos *
Parte central	6,07 ^a	2,65 ^a
Extremidade do caule	6,30 ^a	2,80 ^{ab}
Extremidade da flor	6,13 ^a	3,02 ^b

* Valor médio do número de microrganismos em pepinos de tamanho 3B, expresso em log UFC/g.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste t (LSD_{0,05}) ao nível de 5% de probabilidade.

4.2. MODELAGEM COMPUTACIONAL

Em estudos preliminares, foi observado que não seria possível reduzir a microbiota natural dos pepinos para um número menor que 10^2 e 10^3 UFC/g durante o branqueamento. Os organismos restantes eram provavelmente, resistentes ao calor. Pesquisas adicionais devem ser conduzidas neste sentido para identificar os microrganismos restantes no pepino após o processo de branqueamento.

A maioria da população inicial (microbiota de aeróbios mesófilos) presente nos pepinos foi de 10^5 e 10^6 UFC/g. Isto significa que pelo branqueamento, seria possível reduzir a microbiota natural em no máximo 3-log.

Portanto, no programa envolvendo a parte de cinética de morte microbiana, foi estipulada uma redução de 2-log na população microbiana para validação das equações.

O tempo necessário para redução de 2-log da microbiota de aeróbios mesófilos calculado pelo modelo de transferência de calor e cinética de morte microbiana (TCCMM), para os branqueamentos a 60°C , 80°C e 90°C , foram em torno de 112,5 s, 12,5 s e 6,5 s, respectivamente.

O número de aeróbios mesófilos, depois do branqueamento, foi determinado por contagem padrão. A validação do modelo foi efetuada, comparando-se a redução logarítmica simulada com a redução logarítmica experimental obtida depois do branqueamento.

4.2.1. Comparação entre valores simulados e experimentais

Os valores médios da redução logarítmica de aeróbios mesófilos obtidos experimentalmente e por simulação estão apresentados na Figura 6. Os resultados representam a média de 24 observações para aeróbios mesófilos em cada tratamento.

Os resultados a partir do teste t de comparação pareada indicaram que não existe diferença significativa entre a redução logarítmica experimental e simulada pelo programa, para os branqueamentos descritos acima ($P > 0,05$).

A altas temperaturas, pequenas variações no tempo de branqueamento podem gerar grandes variações na redução logarítmica da microbiota em estudo. Este fato pode ser um dos motivos para a obtenção de maiores variações durante os branqueamentos a 80 e 90°C .

O número de aeróbios mesófilos após o branqueamento e sem branqueamento são mostrados no Quadro 6. Os resultados a partir da análise de variância seguida pelo teste de comparação de média t, indicaram diferença significativa na contagem de aeróbios mesófilos entre os pepinos que

receberam o tratamento térmico mínimo (branqueamento) e aqueles testemunhas ($P>0,05$).

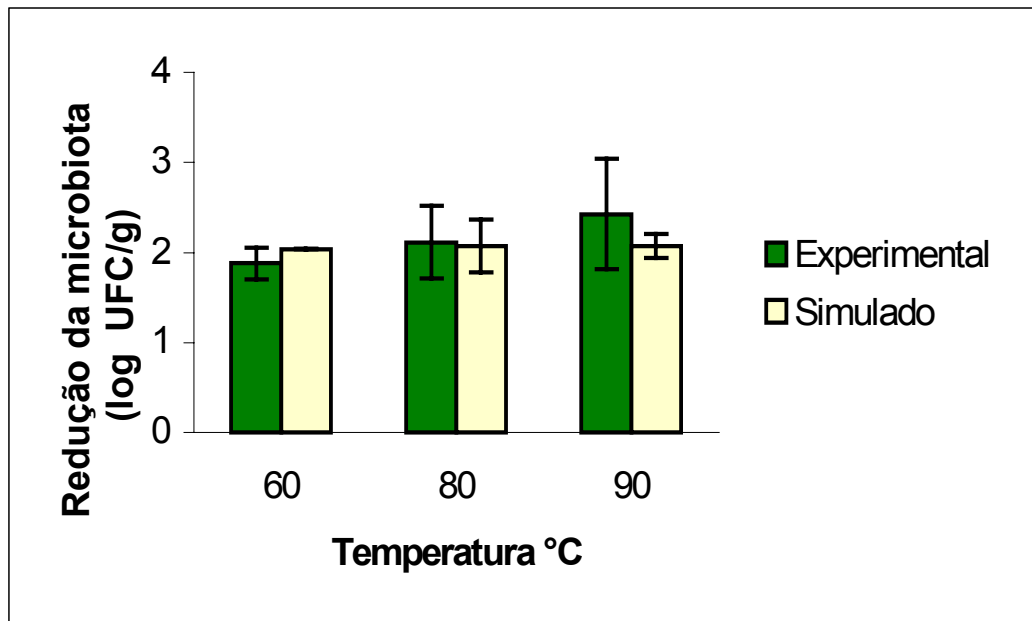


Figura 6. Comparação entre os valores da redução logarítmica de aeróbios mesófilos experimental e simulada pelo modelo TCCMM em diferentes temperaturas de branqueamento ($D_{52}=4,5$ min e $z=7,8^{\circ}\text{C}$).

Nenhum efeito significativo foi detectado em relação ao número de esporos entre as amostras tratadas termicamente a 60°C e 80°C e aquelas que fazem parte do controle ($P>0,05$). Entretanto, para os pepinos que foram branqueados a 90°C , o número de esporos aeróbios mesófilos foi ligeiramente superior comparado com amostras que não foram submetidos ao branqueamento ($P<0,05$).

Apesar da análise estatística ter indicado que a diferença foi significativa, observando os valores absolutos para a contagem dos esporos, essa diferença pode ser considerada não significativa do ponto de vista microbiológico e prático.

Outra hipótese a ser considerada seria que no tratamento a 90°C por 6,5 segundos, os esporos tivessem sofrido um choque térmico estimulando sua

germinação, com uma conseqüente determinação de um número mais elevado para contagem dos mesmos.

Quadro 6. Efeito do processo térmico mínimo sobre a microbiota em pepinos frescos

Tratamento	Aeróbios Mesófilos*	Esporos Aeróbios Mesófilos *
Sem branqueamento	5,60 ^a	2,67 ^a
60 °C/112,5 s	3,66 ^b	2,76 ^{ab}
80 °C/12,5 s	3,61 ^b	2,54 ^a
90 °C/6,5 s	3,28 ^b	2,98 ^b

* Valor médio do número de microrganismos em pepinos com tamanho 3B, expresso em log UFC/g.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste t (LSD_{0,05}) ao nível de 5% de probabilidade.

4.2.2. Localização mais provável dos microrganismos

Os resultados experimentais preliminares mostraram que os microrganismos estão localizados até aproximadamente seis mm \pm 1 de profundidade a partir da superfície dos pepinos de tamanho 3B. Além disso, pesquisas recentes têm indicado que 99,9% da microbiota de aeróbios mesófilos poderiam estar localizadas dentro de dois mm a partir da superfície (BREIDT et al. 1999).

O modelo TCCMM foi usado neste estudo para determinar a localização dos microrganismos dentro do pepino. O modelo calculou o tempo de morte térmica (F_t^Z) para cada posição radial dentro do pepino no tempo t. Desde que, o valor da temperatura é maior próximo à superfície, somente os

valores de F_t^Z próximos da mesma tinham uma contribuição significativa para determinação do tempo de branqueamento e conseqüente inativação microbiana, como ilustrado pela Figura 7.

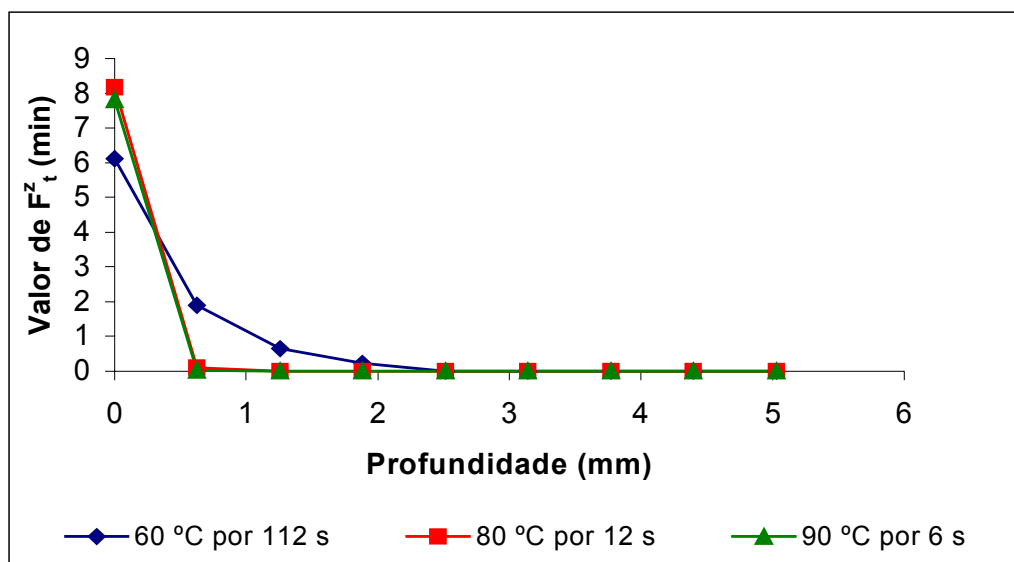


Figura 7. Variação dos valores de morte térmica (F_t^Z) com a profundidade, 0,5 segundos antes do final do branqueamento.

Os valores de profundidade apresentados no Quadro 7 indicam a profundidade a partir da qual a população de aeróbios mesófilos pode estar localizada nos pepinos. A profundidade em que esta população está distribuída foi baseada em resultados da simulação do branqueamento de pepinos a temperaturas de 60, 80, e 90 °C para atingir uma redução em 99 e 99,9% (2 e 3 ciclos log) da população microbiana.

A partir do conhecimento da localização dos microrganismos no pepino, a escolha e otimização de um processo poderão ser realizadas para redução dessa carga microbiana.

O modelo computacional também foi utilizado para analisar o perfil de temperatura no pepino ao final do branqueamento.

A Figura 8 mostra a distribuição de temperatura dentro do pepino após o tempo de branqueamento para cada temperatura estudada. Observou-se que

ao ser atingida uma temperatura de 54°C, a 0,65 mm de profundidade, a redução em 99% da carga microbiana foi alcançada.

Quadro 7. Resultados simulados da localização dos microrganismos

Tratamento (°C)	Profundidade (mm)
60	0,65
80	0,65
90	0,65

O programa também foi utilizado para se obter a variação temporal de temperatura no pepino, visto que estudos preliminares, indicaram presença de microrganismos, mesmo após um longo período de branqueamento (40 minutos a 80 °C).

A Figura 9 mostra que apesar de a temperatura no centro ser maior que 60 °C, após 30 minutos, a 80 °C (superior à temperatura observada, citada anteriormente), não foi verificado uma redução maior que 3-log no número de aeróbios mesófilos presentes no pepino. Os microrganismos sobreviventes ao processo térmico devem ser resistentes ao calor.

Segundo MACKEY e DERRICK (1986), curvas de células sobreviventes no formato côncavo, refere-se à presença de população inicial heterogênea no que diz respeito à resistência térmica. Em alguns casos mais extremos, a fração mais resistente pode fornecer um aumento da “cauda” na curva de sobreviventes (MOATS et al., 1971).

Muito embora, a redução de 5-log, recentemente exigida pela Food and Drug Administration para alguns grupos de alimentos, não ter sido atingida experimentalmente devido à limitação do número inicial da população microbiana nos pepinos e a presença de esporos resistentes ao calor, o modelo TCCMM deverá ser útil na determinação de processos térmicos mínimos para inativação microbiana em pepinos.

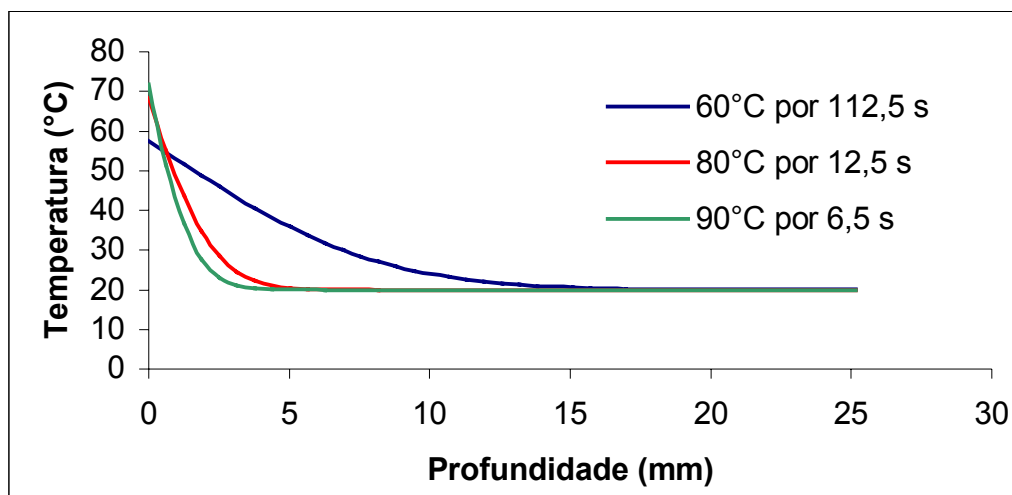


Figura 8. Distribuição de temperatura no pepino ao final do branqueamento.

4.2.3. Análise de sensibilidade para os parâmetros cinéticos

O valor de z empregado neste estudo para aeróbios mesófilos foi de $7,8^{\circ}\text{C}$. Entretanto, dependendo do tipo de microrganismo alvo e o meio de crescimento, este valor pode variar numa faixa entre 4 e 14°C para células vegetativas. O Quadro 8 apresenta o resultado da análise de sensibilidade realizada com o intuito de se verificar o efeito do valor de z sobre o tempo de branqueamento a 80°C para uma redução em 2-log da carga microbiana.

Os resultados mostram que o efeito do valor de z , sobre o tempo de processamento foi significativo. Essa variação torna-se ainda mais significativa quando a temperatura do tratamento térmico é mais elevada, pois neste caso pequenas variações no tempo são suficientes para provocar grandes variações na inativação da população alvo.

Entretanto, grandes variações nos valores de D são encontrados, dependendo do tipo de microrganismos alvo. Por exemplo, microrganismos resistentes ao calor como *B. cereus*, apresentam valores de D_{100} numa faixa de $0,6$ a 27 min (D_{52} variando de $630,95$ a 28393 horas). Enquanto que, valores de D_{52} equivalentes a $4,5$ min foram determinados para aeróbios mesófilos.

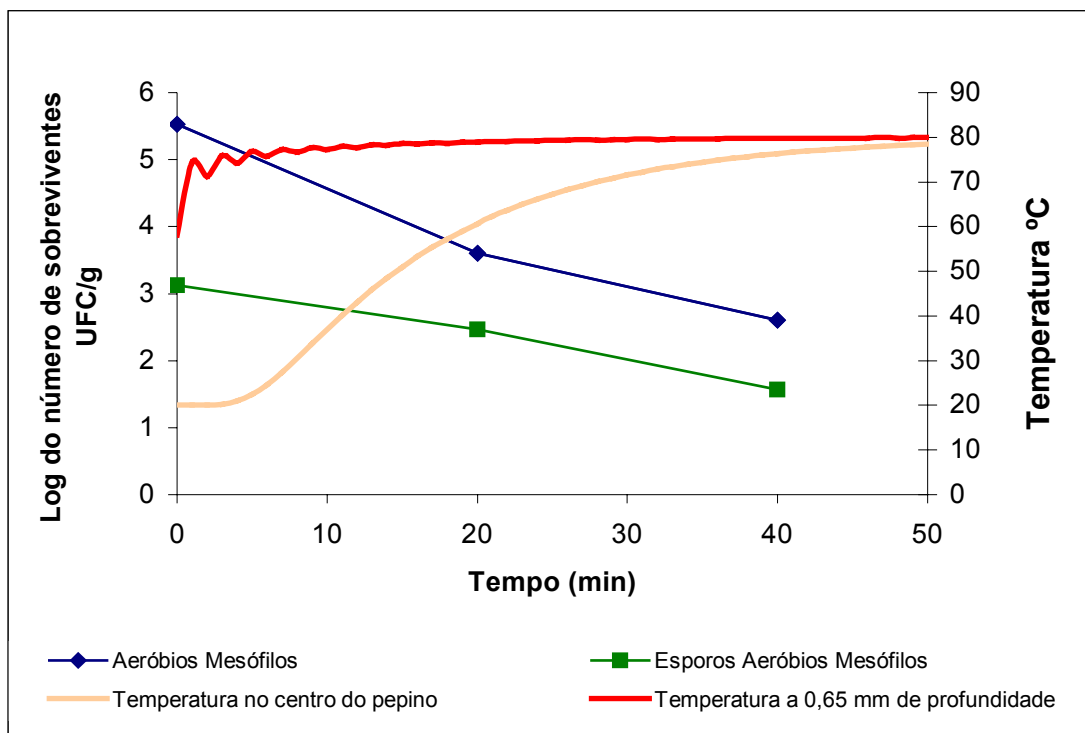


Figura 9. Perfil de temperatura e número de microrganismos sobreviventes no pepino durante o processo de branqueamento a 80°C.

Quadro 8. Análise de sensibilidade do valor de z

Valor de z (°C)	Tempo de Branqueamento (s)
4,0	5,5
7,8	12,0
14,0	29,0

Portanto, uma análise de sensibilidade foi feita para verificar o efeito do valor de D sobre o cálculo do tempo de branqueamento a 80 °C para redução de apenas 1-log do microrganismo alvo. O Quadro 9 apresenta o resultado desta análise. Todos os outros parâmetros de entrada para o modelo foram mantidos constantes, para um valor de z igual a 10 °C.

Quadro 9. Análise de sensibilidade do valor de D

Valor de D₅₂ (min)	Tempo de Branqueamento
4,5	13,5 segundos
37857,0	22 minutos
1703584,0	104 minutos

Estes resultados simulados comprovam a hipótese de presença de microrganismos resistentes ao calor, já que para redução em apenas 1 log destes microrganismos, seria necessário um tempo de processo a 80 °C entre 22 e 104 minutos.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho verificou-se, experimentalmente, a ausência de bactérias na região do endocarpo do pepino. Além disso, pôde ser considerada que a população bacteriana é uniformemente distribuída nas três regiões distintas do fruto (extremidade do caule, centro e da flor).

Um modelo computacional foi desenvolvido para determinar as condições de aquecimento mínimas necessárias para redução da microbiota natural em pepinos, sem alterar significativamente, suas propriedades sensoriais. Uma localização aproximada destes microrganismos também foi obtida por simulação utilizando-se este modelo.

O modelo computacional combina equações de transferência de calor usando a técnica em diferenças finitas e equações de cinética de morte microbiana. As propriedades termofísicas e parâmetros cinéticos foram considerados constantes com a temperatura e obtidos através de dados da literatura. Ao contrário da maioria dos estudos que consideram os parâmetros cinéticos referentes a culturas puras, os valores de D e de z utilizados, referem-se a população (heterogênea) de aeróbios mesófilos presentes no fruto do pepino.

Os valores médios experimentais para a redução da microbiota não foram significativamente diferentes dos valores preditos pelo programa ($P > 0,05$), nas temperaturas de branqueamento testadas (60 °C, 80 °C, 90 °C).

Portanto o modelo pode ser utilizado para simulação da localização desses microrganismos no pepino.

O cálculo do tempo de morte térmica para cada posição radial dentro do pepino permitiu a determinação aproximada para a localização de aeróbios mesófilos no fruto. A simulação foi feita para uma redução de 2 e 3 ciclos log dessa população microbiana, resultando na sua localização em até 0,65mm de profundidade.

Apesar da obtenção de uma redução em 99% (2-log) na microbiota de aeróbios mesófilos em pepinos branqueados a 80°C por 12,5 segundos, não foi possível uma redução superior a 99,9% (3-log), mesmo após 40 minutos de branqueamento a 80°C. Isto demonstrou que há necessidade de outras investigações com relação à população de sobreviventes após o processo de branqueamento.

A recomendação da Food and Drug Administration (FDA) que passou a exigir uma redução em 99,999% (5-log) no número de patógenos para alguns grupos de alimentos, em face dos resultados encontrados no presente trabalho, deveria ser revisto. Devido a limitações no número inicial de microrganismos e presença de organismos resistentes, não seria possível atingir essa redução sem perda de qualidade do produto.

Concluiu-se, então, que o programa computacional poderá ser utilizado para simular tratamentos térmicos mínimos em pepinos, quando uma redução de até 99,9% na microbiota natural for exigida. A aplicação apropriada do modelo computacional à microbiologia de alimentos foi atingida, mesmo usando-se um sistema complexo que é o alimento.

Trabalhos futuros utilizando o modelo desenvolvido poderão explorar o efeito do tratamento térmico na inativação enzimática, tanto para o pepino, quanto para outros produtos vegetais.

Sugere-se que o desenvolvimento do tratamento térmico mínimo deve ser usado em conjunto com a Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), bom práticas agrícolas e de manufatura incluindo treinamento de mão-de-obra, e guias industriais publicados para redução dos perigos microbiológicos. Claramente, o problema é complexo, mas pode ser resolvido. Novas intervenções tecnológicas irão emergir e colaborarão para a

eliminação de microrganismos patogênicos na cadeia de alimentos, desde a fazenda até a mesa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. R., HARTLEY, D. A., COX, L. J. Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. **Food Microbiology**, v. 6, n. 7, p. 69-77, 1989.
- BALL, C. O., OLSON, F. C. W. **Sterilization in food technology**. New York: McGraw Hill, 1957. 654 p.
- BARANYI, J., JONES, A., WALKER, C., KALOTI, A., ROBINSON, T. P., MACKEY, B. M. A combined model for growth and subsequent thermal inactivation of *brochothrix thermosphacta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1029-1035, 1996.
- BARRETT, D. M., THEERAKULKAIT, C. Quality indicators in blanched, frozen, stored vegetables. **Food Technology**, v. 49, n. 1, p. 62-65, 1995.
- BELLARA, S. R., FRYER, P. J., McFARLANE, C. M., THOMAS, C. R., HOCKING, P. M., MACKEY, B. M. Visualization and modeling of the thermal inactivation of bacteria in a model food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3095-3099, 1999.
- BHAMIDIPATI, S., SINGH, R. K. Model system for aseptic processing of particulate foods using peroxidase. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 1, p. 171-179, 1996.

- BREIDT, F., HAYES, J. S., FLEMING, H. P. **Reduction of microflora on whole pickling cucumbers by blanching**. Raleigh, 1999. (Comunicação pessoal).
- BROWN, K. L., AYRES, C. A., GAZE, J. E., NEWMAN, M. E. Thermal destruction of bacterial spores immobilized in food/alginate particles. **Food Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 187-198, 1984.
- CHERRY, J. P. Improving the safety of fresh produce with antimicrobials. **Food Technology**, v. 53, n. 11, p. 54-59, 1999.
- COHEN, J. S., WALL, M. A. A method of calculating average sterilizing value in cylindrical containers. **Transaction of ASAE**, v. 14, n. 2, p. 329-333, 1971.
- DAESCHEL, M. A., FLEMING, H. P. Entrance and growth of lactic acid bacteria in gas-exchange, brined cucumbers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 1111-1118, 1981.
- DAESCHEL, M. A., FLEMING, H. P., POTTS, E. A. Compartmentalization of lactic acid bacteria and yeasts in the fermentation of brined cucumbers. **Food Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 77-84, 1985.
- FASINA, O. O., FLEMING, H. P. **Heat transfer characteristics of cucumber during blanching**. Raleigh, 1999. (Comunicação pessoal).
- FLEMING, H. P., MCFEETERS, R. F., DAESCHEL, M. A. Fermented and acidified vegetables. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. (Eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington, D.C.: APHA, 1992. cap. 50. 1219p.
- HAYAKAWA, K. New parameters for calculating mass average sterilizing values to estimate nutrients in thermally conductive food. **Canadian Institute of Science and Food Technology Journal**, v. 2, n. 4, p. 167, 1969.
- JEN, Y., MANSON, J. E., STUMBO, C. R., ZAHRADNIK, J. W. A procedure for estimating sterilization of and quality factor degradation in thermally processed foods. **Journal of Food Science**, v. 36, n. 2, p. 692-698, 1971.
- LENZ, M. K., LUND, D. B. The lethality-fourier number method: experimental verification of a model for calculating average quality factor retention in

- conduction-heating canned foods. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 4, p. 997-1001, 1977.
- MACKEY, B. M., DERRICK, C. M. Changes in the heat resistance of *Salmonella typhimurium* during heating at rising temperatures. **Letters in Applied Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 13-16, 1987.
- MACKEY, B. M., DERRICK, C. M. Elevation of the heat resistance of *Salmonella typhimurium* by sublethal heat shock. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 61, n. 5, p. 389-393, 1986.
- MANSON, J. E., ZAHRADNIK, J. W., STUMBO, C. R. Evaluation of lethality and nutrient retentions of conduction-heating foods in rectangular containers. **Food Technology**, v. 24, n. 11, p. 109-113, 1970.
- MENELEY, J. C., STANGHELLINI, M. E. Detection of enteric bacteria within locular tissue of healthy cucumbers. **Journal of Food Science**, v. 39, n. 6, p. 1267-1268, 1974.
- MERMELSTEIN, N. H. Annual meeting papers address minimal processing. **Food Technology**, v. 53, n. 9, p. 118-122, 1999.
- MOATS, W. A.; DABBAH, R., EDWARDS, V. M. Interpretation of nonlogarithmic survivor curves of heated bacteria. **Journal of Food Science**, v. 36, n. 1, p. 523-526, 1971.
- NICOLAI, B. M., BROEK, P. V. D., SCHELLEKENS, M., ROECK, G. D., MARTENS, T., BAERDEMAEKER, J. D. Finite element analysis of heat conduction in lasagna during thermal processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 30, n. 4, p. 347-363, 1995.
- OLIVEIRA, M. C. B. M. **Utilização da técnica de diferenças finitas para a simulação do cozimento de carne bovina**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 17p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- PAO, S., DAVIS, C. L. Enhancing microbiological safety of fresh orange juice by fruit immersion in hot water and chemical sanitizers. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 7, p.756-760, 1999.

- PFLUG, I. J., ODLAUG, T. E. A review of z and F values used to ensure the safety of low-acid canned food. **Food Technology**, v. 32, n. 6, p. 63, 1978.
- PFLUG, I. J. **Microbiology and engineering of sterilization process**. 7. ed. Minneapolis, MN: Environmental Sterilization Laboratory, 1990. 20-19 p.
- QUINTAVALLA, S., CAMPANINI, M. Effect of rising temperature on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat emulsion. **Letters in Applied Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 184-187, 1991.
- RAMASWAMY, H. S., AWUAH, G. B., SIMPSON, B. K. Biological verification of fluid-to-particle interfacial heat transfer coefficients in a pilot-scale holding tube simulator. **Biotechnology Progress**, v. 12, n. 4, p. 527-532, 1996.
- RAMASWAMY, H. S., SINGH, R. P. Sterilization process engineering. In: AUTORIA. **Handbook of food engineering practice**. New York: Boca Raton CRC Press, 1997. 718 p.
- REINA, L. D., FLEMING, H.P., HUMPHRIES, E.G. Microbiological control of cucumber hydrocooling water with chlorine dioxide. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 5, p. 541-46, 1995.
- SAMISH, Z., DIMANT, D. The presence of bacteria within cucumber tissue. **Records of the Agricultural Research Station** , N°208-E, 1957.
- SAMISH, Z., DIMANT, D. Bacterial population in fresh, healthy cucumbers. **Food Manufacture**, v. 34, n. 1, p. 17-20, 1959.
- SAPERS, D. M., SIMMONS, G. F. Hydrogen peroxide disinfection of minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, v. 52, n. 2, p. 48-52, 1998.
- SCHUMAN, J. D., SHELDON, B. W., FOEGEDING, P. M. Thermal resistance of *aeromonas hydrophila* in liquid whole egg. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 3, p. 231-236, 1997.
- SIZER, C. E., BALASUBRAMANIAM, V. M. New intervention processes for minimally processed juices. **Food Technology**, v. 53, n. 10, p. 64-67, 1999.

- SMITH, K. R., FLEMING, H. P. Scanning electron microscopy of the surface of pickling cucumber fruit. **Journal of the American Society Horticultural Science**, v. 104, n. 4, p. 528-533, 1979.
- STEVENSON, K. E., SEGNER, W. P. Mesophilic aerobic sporeformers. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. (Eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington, D.C.: APHA, 1992. cap. 18, 1219p.
- SWANSON, K. M. J., BUSTA, F. F., PETERSON, E. H., JOHNSON, M. G. Colony count methods. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. (Eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington, D.C.: APHA, 1992. cap. 4, 1219p.
- TEIXEIRA, A. A., DIXON, J. R., ZAHRADNIK, J. W., ZINSMEISTER, G. E. Computer optimization of nutrient retention in the thermal processing of conduction-heated foods. **Food Technology**, v. 23, n. 6, p. 845-849, 1969.
- TUCKER, G. S., CLARK, P. Modelling the cooling phase of heat sterilization processes, using heat transfer coefficients. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 25, n. 6, p. 668-681, 1990.
- WENG, Z., HENDRICKX, M., MAESMANS, G., TOBBACK, P. Immobilized peroxidase: a potential bioindicator for evaluation of thermal processes. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 2, p. 567-570, 1991.
- WILLIAMS, D. C., LIM, M. H., CHEN, A. O., PANGBORN, R. M., WHITAKER, J. R. Blanching of vegetables for freezing – Which indicator enzyme to choose. **Food Technology**, v. 40, n. 6, p. 130-140, 1986.

APÉNDICE

Comportamento da inativação da microbiota em pepinos durante o processo térmico

Testes preliminares, envolvendo processos de branqueamento, foram realizados para definição do número da redução microbiana em ciclos log a ser empregada no cálculo do valor de F_t^z , para os experimentos subsequentes de validação do modelo.

Amostras de pepinos foram branqueadas a 50, 65 e 80 °C e retiradas em intervalos de 10 minutos durante os 40 minutos de processamento térmico. O número de mesófilos aeróbios sobreviventes ao processo foi determinado após cada intervalo de tempo.

As figuras 1A. a 3A. ilustram o comportamento da inativação da microbiota natural em pepinos durante tratamentos térmicos a diferentes binômios tempo vs. temperatura.

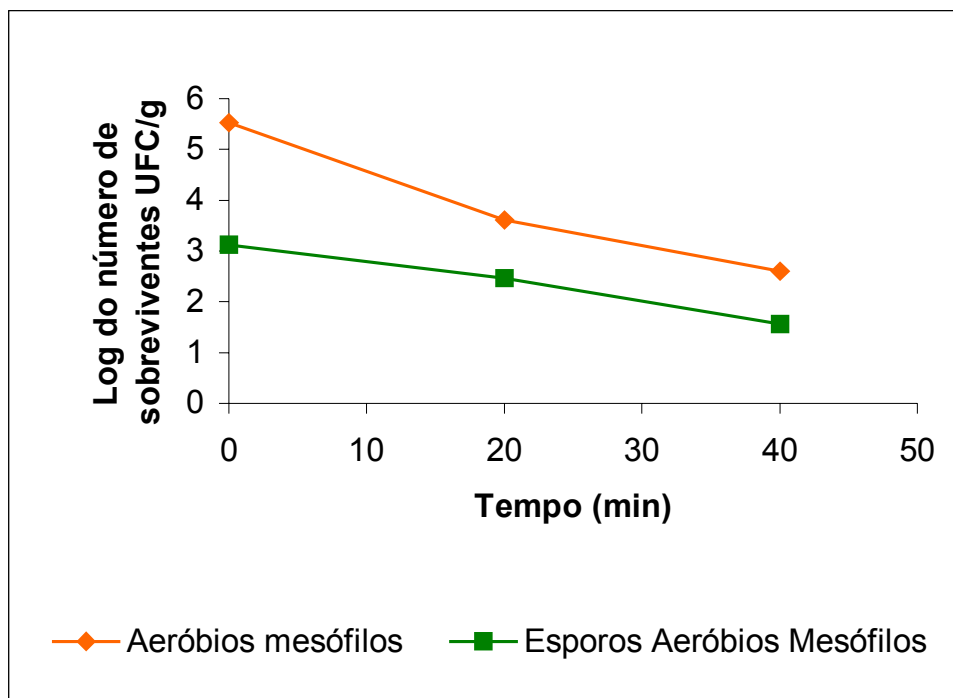


Figura 1A. Redução de microrganismos durante o branqueamento a 80°C.

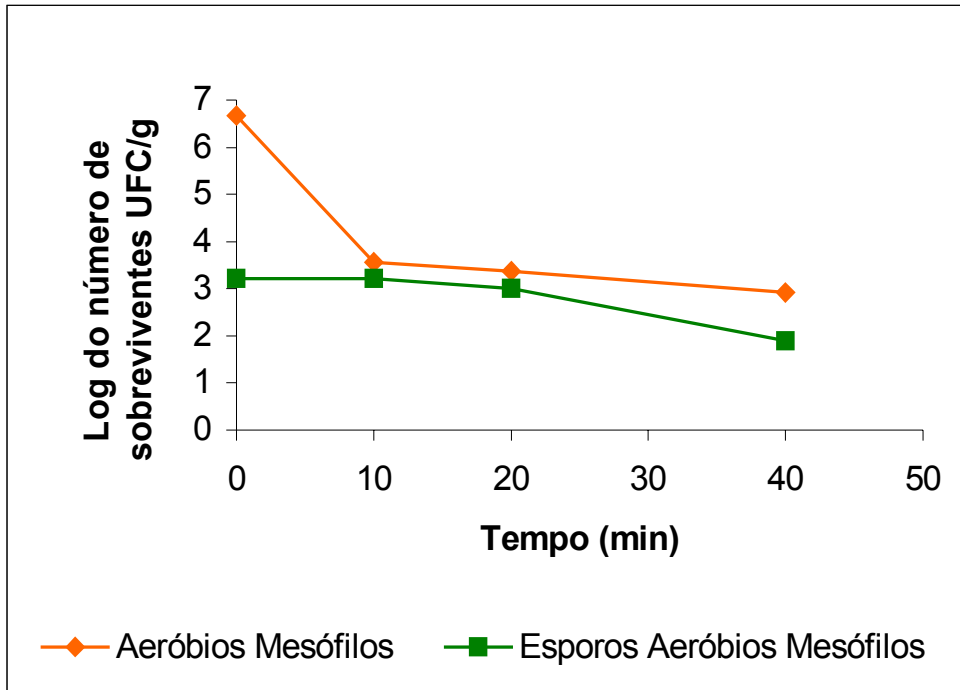


Figura 2A. Redução dos microrganismos durante o branqueamento a 65°C.

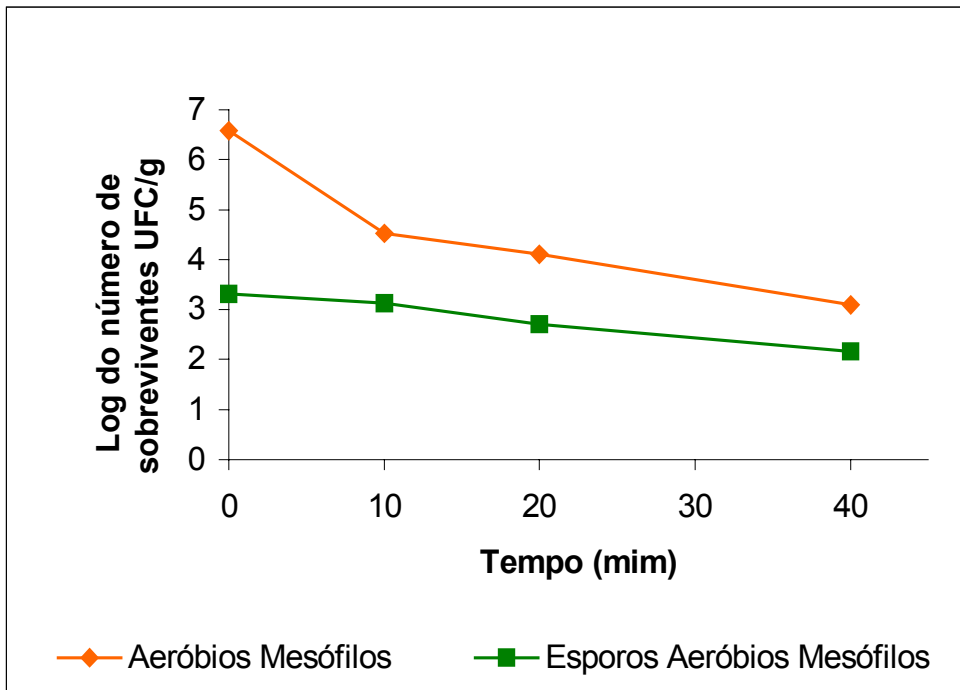


Figura 3A. Redução dos microrganismos durante o branqueamento a 50°C.

Observou-se que mesmo, após um longo período de tempo, a população de mesófilos aeróbios não foi reduzida além de 3-log. A curva de esporos permaneceu praticamente estável, apresentando uma ligeira redução após 20 minutos de processo. Esta redução pode ter ocorrido durante a metodologia para a determinação destes microrganismos, já que durante o procedimento para análise, eles são mantidos a 80 °C por 30 minutos para posterior contagem.